

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAID -TLEMCCEN
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° de série.....

N° d'ordre.....



THÈSE
en vue de l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Chimie Organique

THÈME

**INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE SUR DES EXTRAITS
BIOACTIFS DE DEUX BRASSICACEAE MEDICINALES DU
SUD ALGERIEN : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera***

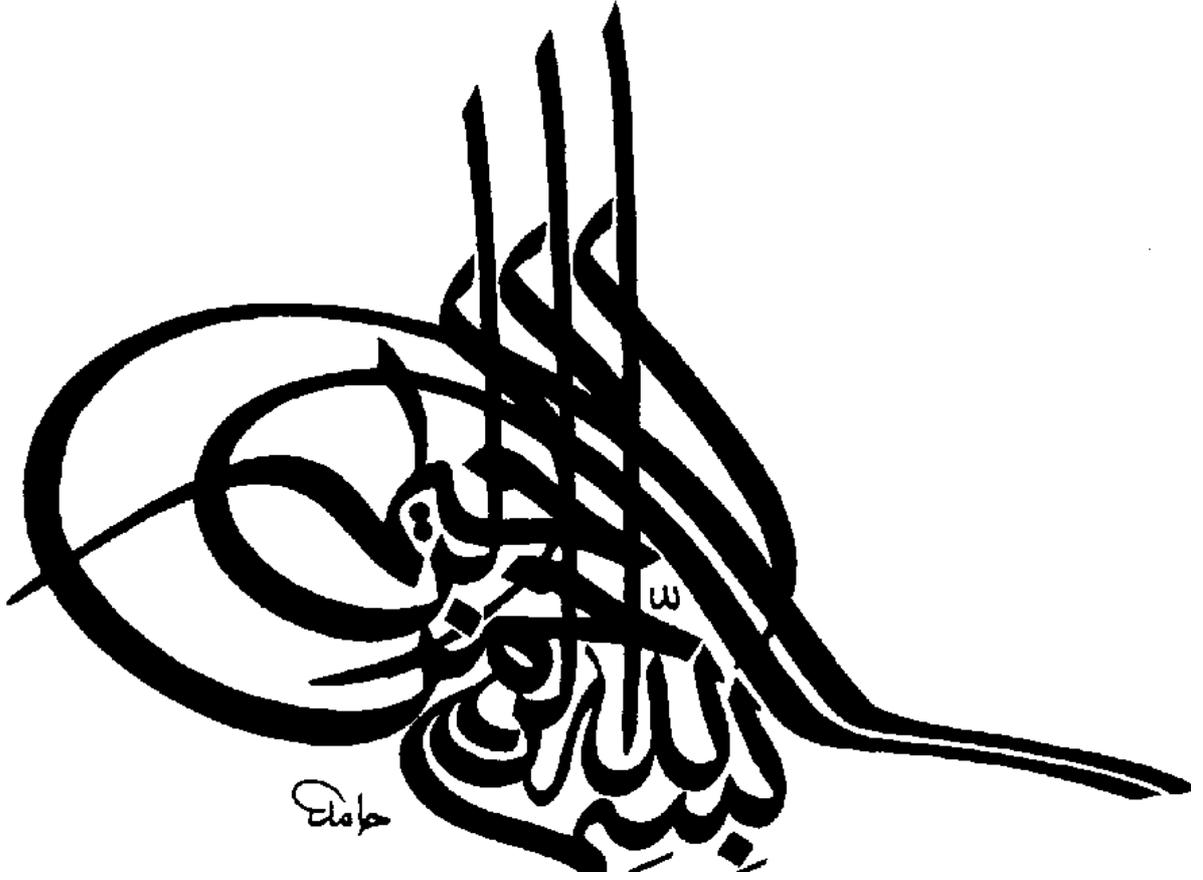
Présentée par

M. BERREGHIOUA Abdelaziz

Soutenue publiquement le: 12 mars 2016 devant le jury composé de:

Pr. HAREK Yahia	Président	Université Abou Bakr Belkaid -Tlemcen
Pr. TABTI Boufeldja	Examineur	Université Abou Bakr Belkaid -Tlemcen
Pr. BELBOUKHARI Nasser	Examineur	Université Tahri Mohammed -Bechar
Pr. ALLALI Hocine	Examineur	Université Abou Bakr Belkaid -Tlemcen
Pr. CHERITI Abdelkrim	Directeur de thèse	Université Tahri Mohammed -Bechar

Année Universitaire : 2015-2016



يارب لا تدعني أصاب بالغرور إذا نجحت...ولا أصاب باليأس إذا فشلت؛ بل ذكرني دائماً
بأن الفشل هو التجارب التي تسبق النجاح.
يارب علمني أن التسامح هو أكبر مراتب القوة و أن حب الانتقام هو أول مظاهر الضعف.
يارب إذا جردتني من المال اترك لي الأمل وإذا جردتني من النجاح اترك لي قوة العناد حتى
أتغلب على الفشل و إذا جردتني من الصحة اترك لي نعمة الإيمان.
يارب إذا أسأت إلى الناس فأعطني شجاعة الاعتذار وإذا أساء الناس إلي فأعطني شجاعة
العفو.

يارب إذا نسيتك لا تنسني.

Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la volonté pour faire ce travail.

*Les travaux de cette thèse se sont déroulés au laboratoire de phytochimie et synthèse organique (LPSO), à l'Université de Bechar, sous la direction de son directeur, le professeur **CHERITI Abdelkrim**.*

*Monsieur, **CHERITI**, Je tiens à vous remercier très vivement d'avoir dirigé ma thèse. Vos intuitions et votre savoir mais aussi votre exigence et vos critiques m'ont permis de comprendre ce qui constitue l'essence d'une démarche scientifique. Vous avez su m'initier à l'esprit de recherche avec rigueur et efficacité et aussi partager votre expérience et votre compétence dans ce domaine de recherche scientifique. Je vous suis très reconnaissant pour l'effort que vous avez fourni pour avoir supervisé, suivi et mené à bien la direction de cette thèse. Et aussi pour toutes les corrections de ce manuscrit que vous avez fait avec beaucoup de patience.*

*Qu'il me soit ici permis de remercier très sincèrement le professeur, **HAREK Yahia**, et de lui adresser toute ma reconnaissance pour avoir jugé ce travail malgré ses nombreuses obligations. Je suis particulièrement honoré de vous avoir vu assurer la Présidence de ce Jury de Thèse.*

*Je remercie vivement le professeur, **TABTI Boufeldja**, d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites d'en être l'examineur. Je suis très honoré d'avoir pu bénéficier de vos remarques éclairées et tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude. Je garderais en mémoire vos grandes qualités, tant humaines, qu'intellectuelles. J'aimerais témoigner ici l'expression d'une sincère et marquante admiration.*

*Qu'il me soit ainsi permis de remercier très sincèrement le professeur, **ALLALI Hocine**, pour avoir spontanément accepté de juger ce travail. Je suis très honoré d'avoir pu bénéficier de vos conseils et tiens à vous assurer de ma considération la plus respectueuse.*

*J'adresse tout particulièrement mes remerciements et ma reconnaissance au professeur, **BELBOUKHARI Nasser**. Je lui suis reconnaissant de la disponibilité dont il a pu faire preuve malgré son emploi du temps surchargé.*

Messieurs les membres de jury, vos remarques et suggestions m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ma thèse.

*Je remercie l'optimiste, **Djellouli Omar**, qui m'a bien des fois aidé à voir le côté positif des choses et à persévérer quand tout me poussait pourtant à arrêter. Je le remercie très sincèrement pour le soutien et les conseils avisés qu'il m'a prodigués au cours de cette thèse.*

Je voudrais remercier mes très chers parents:

Mon père,

Les mots me manquent pour exprimer ce que vous représentez pour moi, ce travail est le fruit de vos prières et vos sacrifices (Allah yarhmak).

Ma mère,

Vos prières et votre "Doua'a" m'ont accompagné tous les jours de mes études; combien long, long a été ce chemin dont j'atteins le but aujourd'hui et ceci grâce à votre soutien moral. Ton amour inconditionnel et ta compréhension me resteront toujours un exemple à suivre. Que ce travail fasse votre fierté et reflète votre image. C'est avec les yeux débordants de larmes d'amour que je rédige ces mots.

Je ne trouverai jamais l'expression forte pour vous exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour tous les sacrifices.

En fin, merci à ma femme qui m'a prouvé à quel point je pouvais compter sur elle. Tout ce que tu as fait pour moi dans les moments difficiles restera gravé dans ma mémoire et je ne pourrais jamais t'en remercier suffisamment.

"Lorsque vous avez éliminé l'impossible, ce qui reste, si improbable soit-il, est nécessairement la vérité." Sir Arthur Conan Doyle Le signe des quatre.

Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux

Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète **Mohamed**, Paix et Salut sur lui, ainsi que ses compagnons, pour nous avoir apporté une religion comme l'Islam

Une chance m'a été offerte aujourd'hui pour parler des personnes qui me sont très chers.

A ma mère;

A l'âme de mon père;

A mes frères et sœurs;

Je dédie spécialement cette thèse à ma femme, à ma fille *Chourouk* et à mon fils *Mohamed Nabil* qui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles, qui ont toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.

Je voudrais simplement leur dire que je les aime de tout mon cœur.

On aime sa famille presque sans le savoir, sans le sentir, car cela est naturel comme de vivre.

Berreghioua Abdelaziz

ملخص
تقص فيتوكيميائي للمستخلصات البيوفعالة لصليبيتين طبيبتين من الجنوب الجزائري: *Zilla macroptera* و *Moricandia arvensis*

هذا العمل يعنى بالدراسة القيتوكيميائية لنببتين طبيبتين وكذلك تقييم فعالية للمستخلصات ضد البكتيريا.

استخراج المركبات و تنقيتها باعتماد التقنيات الكروماتوغرافية، و تحديد البنية باستعمال التقنيات الفيزيائية الكيميائية و المطبافية، مكنتنا من عزل 19 مركبا من الفلافونيدات.

ان القدرة المضادة للنشاط البكتيري قد عينت بطريقة الانتشار على جيلوز ميلر هانتن لسبعة بكتيريا باستعمال مستخلصات الجزء الهوائي (بدون الثمار) لنبتة *Zilla macroptera* ومستخلصات الأوراق لنبتة *Moricandia arvensis*. لقد تبين ان *Pseudomonas aeruginosa* أكثر حساسية لمعظم المستخلصات. النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الايتانولي من نبتة *Zilla macroptera* يعتبر الاهم. المستخلص المائي من أوراق نبتة *Moricandia arvensis* أظهر فعالية معتبرة ضد جميع البكتيريا المختبرة. الكلمات المفتوحة: *Moricandia arvensis*، *Zilla macroptera*، Brassicaceae، طب تقليدي، قلافونيدات، فعالية ضد البكتيريا.

**Phytochemical investigation of bioactive extracts of two medicinal Brassicaceae from south algerian :
Moricandia arvensis and *Zilla macroptera***

Abstract

This work concerned the phytochemical study of two medicinal species, *Moricandia arvensis* and *Zilla macroptera*, together with the evaluation of the antibacterial activity of the crude extracts.

The extraction and purification of the different constituents, based on the use of a combination of chromatographic methods and their structural determination, performed by physicochemical and spectroscopic methods, allowed us to isolate 19 flavonoids.

An investigation by disc diffusion method of antibacterial activity of extracts from aerial parts (without fruits) of *Zilla macroptera* and from *Moricandia arvensis* leaves against seven bacterial strains, shows that *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to the majority of extracts. The antibacterial activity of the ethanol extract from *Zilla macroptera* is more important compared to other extracts. the aqueous extract from *Moricandia arvensis* leaves showed a significant inhibition against all bacteria tested.

Key words: *Moricandia arvensis*, *Zilla macroptera*, Brassicaceae, traditionnel pharmacopoeia, flavonoïds, antibacterial activity.

**Investigation phytochimique des extraits bioactifs de deux brassicaceae medicinales du sud algérien :
Moricandia arvensis et *Zilla macroptera***

Résumé

Ce travail porte sur l'étude phytochimique de deux espèces médicinales, *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts.

L'extraction des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, nous ont permis d'isoler 19 flavonoïdes.

Une investigation de l'activité antibactérienne, par la méthode de diffusion par disques, des extraits de la partie aérienne (sans fruits) de *Zilla macroptera* et des extraits des feuilles de *Moricandia arvensis* contre sept souches bactériennes, montre que *Pseudomonas aeruginosa* est la plus sensible à la majorité des extraits. L'activité antibactérienne de l'extrait ethanolique de *Zilla macroptera* est la plus importante. L'extrait aqueux des feuilles de *Moricandia arvensis* a montré une inhibition significative contre toutes les bactéries testées.

Mots clés : *Moricandia arvensis*, *Zilla macroptera*, Brassicaceae, pharmacopée traditionnelle, flavonoïdes, activité antibactérienne.

Publications et communications

Plusieurs parties des résultats de ce travail ont été présentées sous forme de publications ou communications.

Publications :

1- Berreghioua A., A. Cheriti and N. Belboukhari. **2015**. "Flavone and flavone glucuronide from *Zilla macroptera* L.(Brassicaceae) growing in Algerian Sahara" *Der Pharma Chemica*, 7(8):197-201.
<http://derpharmachemica.com/archive.html> (Annexe)

2-Berreghioua A., Cheriti A. and Belboukhari N. **2013**. "Preliminary phytochemical investigation of antibacterial extracts from *Moricandia arvensis* growing in Algerian Sahara" *Natural products an indian journal*, 9(8), 322-325. (Annexe)

<http://www.tsijournals.com/tsijournals/Journals/Natural-Products-An-Indian-Journal/index.html>

3-Berreghioua A., Cheriti A. and Belboukhari N. **2014**. "Antibacterial activity of *Zilla macroptera* extracts from Algerian Sahara" *Phytochem&BioSub Journal*. vol.8 (2), 92-96. (Annexe)
<http://pcbsj.webs.com/>

4-Berreghioua A. et Cheriti A. **2011**. "Place de *Moricandia arvensis* dans l'ethnopharmacologie au sud ouest Algérien" *Annales de l'université de Bechar*. n°10, 151-157.

<http://hawliiate.weebly.com/volumes-10--9-2011.html>

5-Berreghioua A., Cheriti A. Belboukhari N. et Marouf A. **2009**. "Aperçu ethnopharmacologique et chimique des Brassicaceae". *Annales de l'Université de Bechar*. n°5, 15-27.

<http://hawliiate.weebly.com/volumes-6--5-2009.html>

Communications :

1-Berreghioua A., Cheriti A. and Belboukhari N. **2013**. "Ethnomedical survey, phytochemical screening and antibacterial activity of different extracts from *Zilla macroptera*". 4^o *phytochem&BioSub*. 1 et 2 décembre, Bechar, Algérie. (Poster)

2-Berreghioua A. et Cheriti A. **2011**. "Ethnopharmacologie et Screening phytochimique de deux Brassicaceae du Sud Ouest Algérien". 3^o *PhytoChem & BioSub Conference*. 04 et 05 décembre. Bechar, Algérie.

3-Berreghioua A. and Cheriti A. **2009**. "Antimicrobial evaluation of different crude extracts from *Moricandia arvensis* (Brassicaceae)" 2^o *phytochem&BioSub Conference*. 04-05 décembre, Bechar, Algérie. (Poster)

*ABREVIATIONS,
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX,
TABLE DES MATIERES*

Abréviations

- ADN**: Acide désoxyribonucléique
ADP: Adénosine di-phosphate
AMP: Adénosine mono-phosphate
ARN: Acide ribonucléique
ATP: Adénosine tri-phosphate
ASE: Accelerated Solvent Extraction
APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
APG II: Angiosperm Phylogeny Group
ATCC: American Type Culture Collection
- BAW**: *n*-Butanol/ Acide acétique/ eau (water)
BuOH: Butanol
- CCM**: Chromatographie sur couche mince
CC: Chromatographie sur colonne
CPG: Chromatographie à phase gazeuse
CPC: Chromatographie de Partage Centrifuge
CLHP (HPLC): Chromatographie Liquide à Haute Performance
CDCl₃: Chloroforme deteurié
CFU: Unités formatrices de colonies
CP: Chromatographie sur papier
CMB: Concentration minimale bactéricide
- d*: Doublet (RMN)
dd: Doublet dédoublé
DAD: Diode Array Detector
DMSO: Diméthyle sulfoxyde
- ESI**: Electrospray Ionisation
EP: Ether de pétrole
ES: Eectrospray Spectrometry
et al.: *et alii* (et autres auteurs)
Et₂O: Ether di éthylique
EI: Ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization*)
- FAS**: Fatty Acid Synthase
FT-IR: Transformation de Fourier- Infra rouge
FID: Detecteurs à ionisation de flamme
- FAB**: Fast Atomic Bombardment
- FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power
GLC: GLuCosinolates
GLU: GLUcose
- HIV**: Human Immunodeficiency Virus
Hz Hertz
- IUPAC**: International Union of Pure and Applied Chemistry
iNOS: oxyde nitrique synthase inducteur
- J**: Constante de couplage
- LC-MS** Chromatographie Liquide / Spectroscopie de Masse
LPSO: Laboratoire de phytochimie et synthèse organique
- μL**: Microlitre
μg: Micrograme
m: Multiplet
m/z: Masse / charge électrique
MT: Médecine traditionnelle
MeOH: Méthanol
Ma₁B₁, Ma₂C₂.....: Désignation des composés naturels isolés de la plante *Moricandia arvensis*
MAW: Methanol acide acétique eau (water)
MRP: Multidrug resistance associated protein
- NIH**: National Institutes of Health
- δ**: Déplacement chimique
- O⁻²**: Anion superoxyde
OH[•]: Radical hydroxyle
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OFT: Oligomères flavonoïques totaux
- ppm**: Partie par million
PAM: Plantes Aromatiques et Médicinales
PAF: Platelet Activating Factor
PLE: Pressurized Liquid Extraction
PDE: Phosphodiesterase
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
- R_f**: Facteur de rétention
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
ROO[•]: Radical peroxyde
RDA: Retro-Diels-Alder
- s*: Singulet
SAR: Relation Structure –Activité
SWE: Subcritical Water Extraction
SFE: Subcritical Fluid Extraction
SAM: S-Adenosyl-Méthionine
SIDA: Syndrome d’immunodéficience acquise
SM: Spectroscopie de masse
MRSA: *Staphylococcus aureus* méticilline résistants
- TMS**: Tétraméthylsilane
TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
t: Triplet
t-**BAW**: *t*-Butanol Acide acétique eau (water)

UV: Ultraviolet

USA: United States of America

UDP-GLU: Uridine diphosphate glucose.

Vis : Visible

Zm₁C₁, Zm₂Ac₁, ... : Désignation des composés naturels isolés de la plante *Zilla macroptera*.

Liste des figures et tableaux

Chapitre I

Fig.1.1. Timbres d'Algérie illustrant quelques plantes	009
Tab.1.1. Quelques formes galéniques utilisées.....	012
Fig.1.2. Structures de quelques acides organiques.....	013
Tab.1.2. Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes.....	014
Fig.1.3. Structures des tanins hydrolysables et condensés.....	015
Fig.1.4. Structures de coumarine.....	016
Fig.1.5. Structure d'esculine.....	016
Fig.1.6. Squelette de base de lignanes.....	016
Fig.1.7. Structures de quelques alcaloïdes.....	017
Fig.1.8. Exemples de structures de monoterpènes.....	018
Fig.1.9. Exemples de structures de sesquiterpènes.....	018
Fig.1.10. Structure de deux flavonoïdes. A : O-hétéroside, B : C-hétéroside... ..	019
Fig.1.11. structures de quelques glycosides isolés à partir des fleurs de <i>Moricandia arvensis</i> ...	019
Fig.1.12. Squelette de base des saponines A: à genine stéroïdique B: à genine triterpénique .	020
Fig.1.13. structure de la dioscine.....	020
Fig.1.14. Hétérosides cardiotoniques.....	021
Fig.1.15. Exemple de drogues à hétérosides anthracéniques.....	021
Fig.1.16. Exemple de drogues à hétérosides cyanogéniques.....	022
Fig.1.17. Structure de base des glucosinolates.....	022
Fig.1.18 Structure de sitostérol.....	022
Fig.1.19. Structure de vitamine D2.....	023
Tab.1.3. Récapitulatif des éléments actifs des plantes.....	024
Tab.1.4. Plantes prises comme exemples pour la corrélation.....	026
Tab.1.5. Corrélation entre usage de la plante et son principe actif	027

Chapitre II

Tab.2.1. Distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.....	036
Fig.2.1. Squelette de base des flavonoïdes	037
Tab.2.2. Principales classes des flavonoïdes.....	039
Fig.2.2. Squelette des flavonoïdes avec la numérotation des carbones.....	040
Fig.2.3. Exemples de nomenclature.....	041
Fig.2.4. La biosynthèse des flavonoïdes.....	042
Fig.2.5. Autre voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	043
Fig. 2.6. Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R [*]).....	045
Fig.2.7. Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me ^{nt})	046
Tab.2.3. Quelques flavonoïdes antimicrobiens	046
Tab.2.4. Quelques médicaments à base de flavonoïdes.....	050
Fig.2.8. Système soxhlet.....	052
Fig.2.9. Système Soxtec.....	053
Fig.2.10. Schéma du système d'extraction CO ₂ des solides.....	055
Tab.2.5. Quelques propriétés des solvants utilisés en phytochimie.....	057
Fig.2.11. Chromatogramme HPLC de quelques flavonoïdes.....	061
Tab. 2.6. Quelques méthodes chromatographiques.....	062
Tab. 2.7. Prédiction de la structure à partir de la fluorescence sous lumière de wood	063
Tab. 2.8. La relation entre le R _f et la structure flavonique.....	063
Fig.2.12. Les formes limites et les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	065
Tab. 2.9. Gammas des longueurs d'onde d'absorption UV des différentes flavonoïdes... ..	065
Fig.2.13. Spectres UV-Vis de quelques flavonoïdes.....	066
Fig.2.14. Spectres UV-Vis de flavone.....	068

Fig.2.15. Spectres UV-Vis de flavonol.....	068
Fig.2.16. Formation des différents complexes après addition d'AlCl ₃ en présence de HCl.....	068
Tab. 2.10. Informations structurales provenant des déplacements induits par les réactifs...	069
Tab. 2.11. Quelques valeurs de nombre d'onde des bandes caractéristiques	070
Fig.2.17. Exemples de voies de fragmentation des flavonoïdes.....	071
Tab. 2.12. Déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau A	073
Tab. 2.13. Déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau B	073
Fig.2.18. Spectres UV-Vis de la quercétine enregistré par HPLC-DAD.....	076

Chapitre III

Fig.3.1. Morphologie de Brassicaceae.....	090
Tab.3.1. Classification évolutive des Brassicaceae.....	091
Tab.3.2. Exemples de quelques genres de Brassicaceae.....	091
Fig. 3.2. <i>M.arvensis</i> (son biotope et sa morphologie).....	094
Fig.3.3. <i>Z.macroptera</i> (son biotope et sa morphologie).....	096
Fig.3.4. Carte d'Algérie.....	098
Fig.3.5. Fiche d'enquête ethnopharmacologique.....	099
Tab.3.3. L'essentiel des plantes inventoriées dans la région d'étude.....	100
Tab.3.4. Quelques Brassicacées inventoriées au sud ouest d'Algérie.....	101
Tab.3.5. Usage de quelques brassicacées inventoriées au sud ouest d'Algérie...	102
Histogramme 3.1. Usage de quelques brassicacées inventoriées au sud ouest d'Algérie	103
Tab.3.6. Mode-usage de la plante <i>M.arvensis</i>	104
Tab.3.7. Taux d'usage et maladies traitées par <i>Z. macroptera</i>	105
Histogramme 3.2. Taux d'usage et maladies traitées par <i>Z. macroptera</i>	105
Tab.3.8. Quantités prises par jour (la partie aérienne de <i>Z.macroptera</i>)	105
Tab.3.9. Répartition des tradipraticiens en fonction de l'âge et du sexe.....	106

Chapitre IV

Tab.4.1. Structures de quelques glucosinolates.....	111
Fig.4.1. Structures de six dérivés d'acide benzoïque.....	112
Tab.4.2. Distribution de dérivés des acides cinnamiques dans la famille des Brassicacées ...	112
Tab.4.3. Structures de quelques flavones.....	113
Tab.4.4. Structures de quelques flavanones et flavanols.....	113
Tab.4.5. Structures de quelques flavonols	114
Tab.4.6. Structures de phytosterols isolés.....	115
Fig.4.2. Structure de brassinolide	116
Fig.4.3. Structures de quelques alcaloïdes isolés.....	116
Tab.4.7. Valeur nutritive de <i>M.arvensis</i>	116
Fig.4.4. Réaction de formation de l'ion complexe.....	119
Fig.4.5. Comportement des saponines en milieu aqueux.....	120
Fig.4.6. Réaction de caractérisation des anthraquinones.....	120
Fig.4.7. Mécanisme de réaction avec NaOH	122
Fig.4.8. Réaction de formation d'instauration supplémentaire	123
Fig.4.9. Mécanisme de protection du groupement OH	123
Schéma 4.1: Etapes de l'extraction à partir de <i>M. arvensis</i> (1er protocole).....	126
Schéma 4.2 : Différentes étapes de l'extraction à partir de <i>M.arvensis</i> (2ème protocole) ...	127
Schéma 4.3: Etapes de l'extraction à partir de <i>Z. macroptera</i> (1er protocole)	128
Schéma 4.4: Etapes de l'extraction à partir de <i>Z. macroptera</i> (2ème protocole) ...	129
Tab.4.8. Résultats de screening phytochimique	133
Tab.4.9. Résultats de criblage des différents extraits (feuilles de <i>M. arvensis</i>).....	133
Tab.4.10. rendement de l'extraction	134
Tab.4.11. Résultats d'analyse par CCM (extrait d'acétate d'éthyle)	134

Tab.4.12. Résultats d'analyse par CCM (extrait chloroformique)	134
Tab.4.13. Résultats d'analyse par CCM (extrait hexanique)	134
Tab.4.14. fractionnement de l'extrait chloroformique	135
Tab.4.15. Rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique	136
Tab.4.16. Fractionnements du lot 2 de l'extrait chloroformique	136
Tab.4.17. Rassemblement des sous lots du lot 2	136
Tab.4.18. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle	137
Tab.4.19. Rassemblement des fractions de l'extrait d'acétate d'éthyle	138
Schéma 4.5: Organigramme récapitulatif des étapes de séparation.....	139
Tab.4.20. résultat d'extraction	140
Tab.4.21. Résultats d'analyse par CCM (extrait d'acétate d'éthyle)	140
Tab.4.22. Résultats d'analyse par CCM (extrait de butanol)	140
Tab.4.23. Résultats d'analyse par CCM (extrait ether diéthylique)	140
Tab.4.24. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle	141
Tab.4.25. Rassemblement des fractions de l'extrait d'acétate d'éthyle	142
Tab.4.26. Fractionnement de l'extrait butanolique	142
Tab.4.27. Présentation des lots obtenus à partir d'extrait butanolique	143
Tab.4.28. Fractionnement de l'extrait éther diéthylique.....	143
Tab.4.29. Rassemblement des fractions de l'extrait ethero-diéthylique	144
Tab.4.30. Fractionnements du lot 2 de l'extrait ether diéthylique.....	144
Tab.4.31. Rassemblement des sous lots du lot 2	144
Tab.4.31a. Fractionnements du lot 5 de l'extrait ether diéthylique	145
Tab.4.32. Rassemblement des sous lots du lot 5	145
Schéma 4.6 : Organigramme récapitulatif des étapes de séparation (2 ^{ème} protocole).....	146
Tab.4.33. Résultat d'extraction.....	147
Tab.4.34. Résultat CCM (extrait Chloroforme).....	147
Tab.4.35. Résultat CCM (Extrait d'AcOEt)	147
Tab.4.36. Résultat CCM (Extrait butanolique)	148
Tab.4.37. Rassemblement des fractions de l'extrait butanolique	148
Tab.4.38. Fractionnements du lot 8 de l'extrait butanolique	149
Tab.4.39. Rassemblement des fractions de l'extrait acetate d'éthyle.....	149
Tab.4.40. Fractionnement de l'extrait chloroformique	150
Tab.4.41. Rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique	150
Tab.4.42. Fractionnements du lot 10 de l'extrait chloroformique	151
Schéma 4.7: Organigramme récapitulatif des étapes de séparation (1 ^{er} protocole)....	152
Tab.4.43. Résultat d'extraction	153
Tab.4.44. Résultat CCM (Extrait d'Ether di éthylique).....	153
Tab.4.45. Résultat CCM (Extrait d'AcOEt)	153
Tab.4.46. Résultat CCM (Extrait butanolique).....	153
Tab.4.47. Fractionnement de l'extrait de l'acetate d'ethyle.....	154
Tab.4.48. Rassemblement des fractions.....	154
Schéma 4.8: Organigramme récapitulatif des étapes de séparation (2 ^{er} protocole)....	155
Tab.4.49. Données spectrales IR des composés isolés (pastilles de KBr).....	158
Tab.4.50. Comportement chromatographique du composé Ma ₁ C ₂	160
Tab.4.51. Données de la série spectrale UV.....	161
Tab.4.52. Données spectrales IR du composé Ma ₁ C ₂	161
Tab.4.53. Données de la série spectrale RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	162
Fig. 4.10: Structure de 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone (Hesperitine).....	162
Tab.4.54. Comportement chromatographique du composé Ma ₁ C ₃	162
Tab.4.55. Donnés spectrales UV de Ma ₁ C ₃	163
Tab.4.56. Données spectrales IR du composé Ma ₁ C ₃	163
Tab.4.57. Données spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C	163
Fig.4.11. Structure de 5-hydroxxy 6, 7, 4'-triméthoxyflavone.....	164
Tab.4.58. Comportement chromatographique du composé Ma ₁ Ac ₁	164
Tab.4.59. Données spectrales UV.....	165

Tab.4.60. Données spectrales IR du composé Ma_1Ac_1	165
Tab.4.61. Données spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C	165
Fig.4.12. Structure de (4', 5,7-trihydroxy 6-methoxyflavone)	166
Tab.4.62. Comportement chromatographique du composé Ma_1Ac_2	166
Tab.4.63. Données de la série spectrale UV	167
Tab.4.64. Données spectrales IR du composé Ma_1Ac_2	167
Tab.4.65. Données de la spectroscopie RMN ¹ H et RMN ¹³ C	167
Fig.4.13. Structure du 5,7-dihydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavone	168
Tab.4.66. Comportement chromatographique du composé Ma_2Ac_2	168
Tab.4.67. Données spectrales UV du composé Ma_2Ac_2	168
Tab.4.68. Données spectrales IR du composé Ma_2Ac_2	169
Tab.4.69. Données spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	169
Fig. 4.14: Structure du composé 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone.....	170
Tab.4.70. Comportement chromatographique du composé Ma_2Ac_3	170
Tab.4.71. Données de la série spectrale UV	171
Tab.4.72. Données spectrales IR du composé Ma_2Ac_3	171
Tab.4.73. Donnés spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Ma_2Ac_3	171
Fig.4.15. Structure de 5,7,4'-trihydroxy-3,6,8,3'-tetraméthoxyflavone	172
Tab.4.74. Comportement chromatographique du composé Ma_2B_2	172
Tab.4.75. Données spectrales UV de Ma_2B_2	172
Tab.4.76. Données spectrales IR du composé Ma_2B_2	173
Tab.4.77. Données spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Ma_2B_2	173
Fig. 4.16. Structure de 3,3',4', 5,7- pentahydroxy flavane (catéchine)	174
Tab.4.78. Comportement chromatographique du composé Ma_2E_1	174
Tab.4.79. Données spectrales UV de Ma_2E_1	174
Tab.4.80. Données spectrales IR du composé Ma_2E_1	175
Tab.4.81. Données spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Ma_2E_1	175
Fig.4.17. Structure de 3- glycosyl 3',4',5,7 tetrahydroxy flavonol ou 3- glycosyl quercétine ...	176
Tab.4.82. Comportement chromatographique du composé Ma_2E_2	176
Tab.4.83. Donnés de la série spectrale UV du composé Ma_2E_2	177
Tab.4.84. Données spectrales IR du composé Ma_2E_2	177
Tab.4.85. Déplacements chimiques des protons et carbones du produit Ma_2E_2	178
Fig.4.18. Structure de Keampférol-3-digalactopyranoside	179
Tab.4.86. Comportement chromatographique du composé Zm_1C_1	179
Tab.4.87. Données spectrales UV du composé Zm_1C_1	179
Tab.4.88. Données spectrales IR du composé Zm_1C_1	180
Tab.4.89. Données de la spectroscopie RMN ¹ H	180
Fig. 4.19. Structure de 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone(genisteine)	181
Tab.4.90. Comportement chromatographique du composé Zm_1C_2	181
Tab.4.91. Résultats de la spectrosopie UV du produit Zm_1C_2	181
Tab.4.92. Données spectrales IR du produit Zm_1C_2	182
Tab.4.93. Données de la RMN ¹ H et RMN ¹³ C	183
Fig.4.20: Structure de 4', 5, 7-trihydroxyflavone (Apigénine)	183
Tab.4.94. Comportement chromatographique du composé Zm_1Ac_1	183
Tab.4.95. Données spectrales UV du composé Zm_1Ac_1	184
Tab.4.96. Données spectrales IR du composé Zm_1Ac_1	184
Tab.4.97. Données de la spectroscopie RMN ¹ H et RMN ¹³ C	185
Fig.4.21 : Structure de 8,4' -diméthoxy,5,7-dihydroxyflavone	185
Tab.4.98. Comportement chromatographique du compose Zm_1Ac_2	186
Tab.4.99. Données de la spectroscopie UV	186
Tab.4.100. Données spectrales IR du compose Zm_1Ac_2	186
Tab.4.101. Résultats RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Zm_1Ac_2	187
Fig.4.22. Structure du composé Zm_1Ac_2	188
Tab.4.102. Comportement chromatographique du composé Zm_1Ac_3	188
Tab.4.103. Données de la série spectrale UV	188

Tab.4.104. Données spectrales IR du composé Zm_1Ac_3	189
Tab.4.105. Donnés spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C	190
Fig.4.23 structure de 2,5,7,3',4'-pentahydroxy-8 [-3''-methyl cyclopentoxy]isoflavone	190
Tab.4.106. Comportement chromatographique du compose Zm_1B_1	191
Tab.4.107. Données de la série spectrale UV	191
Tab.4.108. Données spectrales IR du compose Zm_1B_1	191
Tab.4.109. Données de la RMN ¹ H et RMN ¹³ C	192
Fig.4.24: structure du composé 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone (lutéoline)	192
Tab.4.110. Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_1	192
Tab.4.111. Données de la série spectrale UV	193
Tab.4.112. Données spectrales IR du composé Zm_2Ac_1	193
Tab.4.113. Donnés spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C	194
Fig.4.25. Structure de 5,3'-dihydroxy-6,8,4',5'-tetramethoxy-7- [2''(4''-methyl pentyl cyclohexyl) vinyloxy]flavone	194
Tab.4.114. Comportement chromatographique du compose Zm_2Ac_2	195
Tab.4.115. Données de la série spectrale UV	195
Tab.4.116. Données spectrales IR du composé Zm_2Ac_2	195
Tab.4.117. Données de la série spectrale RMN ¹ H et RMN	196
Fig. 4.26. Structure de 5,7-dihydroxyflavone (chryisine)	196
Tab.4.118. Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_3	196
Tab.4.119. Données de la série spectrale UV	197
Tab.4.120. Données spectrales IR du composé Zm_2Ac_3	197
Tab.4.121. Donnés spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Zm_2Ac_3	198
Fig.4.27. Structure de 3,5,6,7,4',5'-hexahydroxy-3'-methoxy-8-[methyl-(5'',5''-dimethylcyclohexyl) methylacetate] flavonol.....	198
Tab.4.122. Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_4	199
Tab.4.123. Données de la série spectrale UV	199
Tab.4.124. Données spectrales IR du composé Zm_2Ac_4	199
Tab.4.125. Donnés spectrales RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé Zm_2Ac_4	200
Fig.4.28 structure de 7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-6,5'-dihydroxybenzoloxy-8-[-2''-methyl pentyl-2''-enyl] -3-[-2''-methylbut-2''-enyl] flavone	201
Tab.4.126. Composés isolés de la plante <i>Moricandia arvensis</i>	202
Tab.4.127. Composés isolés de la plante <i>Zilla macroptera</i>	203
Fig.4.29. Structure de chloramphénicol	206
Fig.4.30. Préparation de l'inoculum	207
Tab.4.128. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition (<i>M.arvensis</i>)	210
Tab.4.129. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition (<i>Z.macroptera</i>)	211
Fig.4.31. Angle de torsion (θ).....	217

Table des matières

Remerciements.....	i
Dédicace.....	iv
Résumé	v
Publications et communications.....	vi
Abréviations.....	viii
Liste des figures, des tableaux et des annexes.....	x
Table des matières.....	xvi
<i>Introduction générale</i>	1

Chapitre I

Plantes médicinales : usages et chimie.....7

1. Un peu d'histoire.....	8
2. Utilisation des plantes médicinales.....	10
3. Chimie des plantes.....	12
3.1. Molécules issues du métabolisme primaire.....	12
3.1.1. <i>Les glucides</i>	12
3.1.2. <i>Les acides aminés et organiques</i>	12
3.1.3. <i>Les lipides</i>	13
3.2. Molécules issues du métabolisme secondaire.....	13
3.2.1. <i>Les composés phénoliques</i>	14
3.2.2. <i>Les alcaloïdes</i>	17
3.2.3. <i>Les huiles essentielles</i>	18
3.2.4. <i>Les huiles grasses</i>	18
3.2.5. <i>Les hétérosides ou glycosides</i>	19
3.2.6. <i>Les phytosterols</i>	22
3.2.7. <i>Les Polysaccharides</i>	23
3.2.8. <i>Les vitamines</i>	23
3.2.9. <i>Les constituants minéraux</i>	24
4. Valeur économique des plantes médicinales.....	27
Conclusion.....	29
Eléments des références bibliographiques.....	30

Chapitre II

Les flavonoïdes: aperçu général.....34

1. Généralités.....	35
2. Distribution et localisation.....	35
2.1. Distribution.....	35
2.2. Localisation.....	36
3. Structure chimique et classification.....	37
3.1. Structure.....	37
3.2. Classification.....	37

3.2.1. Flavones et Flavonols.....	37
3.2.2. Flavanones et Dihydroflavanonols.....	38
3.2.3. Flavan-3-ols, Flvan-3,4-diols.....	38
3.2.4. Chalcones.....	38
3.2.5. Anthocyanes.....	38
4. Nomenclature.....	40
5. Biosynthèse.....	41
6. Substitutions du squelette flavonoïque.....	44
7. Propriétés des flavonoïdes.....	44
7.1. Propriétés antiradicalaires.....	44
7.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques.....	45
7.3. Effets antimicrobiens des flavonoïdes.....	46
7.3.1. Activité antibactérienne.....	46
7.3.2. Activité antifongique.....	46
7.4. Propriétés anticancéreuses.....	47
7.5. Propriétés anti inflammatoires.....	47
7.6. Propriétés antivirales.....	48
7.7. Propriétés antiallergiques.....	48
7.8. Propriétés nutraceutiques.....	48
7.9. Activité anti-ulcérogène.....	48
7.10. Prévention de la cataracte diabétique.....	49
7.11. Activité anti-ostéoporose.....	49
7.12. Autres propriétés des flavonoïdes.....	49
8. Etude chimique des flavonoïdes.....	50
8.1. Extraction.....	50
8.1.1. La macération.....	51
8.1.2. L'extraction par l'appareil de Soxhlet.....	51
8.1.3. La percolation.....	53
8.1.4. L'extraction par fluide pressurisé.....	53
8.1.5. L'extraction par eau subcritique.....	54
8.1.6. L'extraction par fluide supercritique.....	54
8.1.7. Extraction par micro-ondes.....	55
8.1.8. Extraction liquide- liquide.....	55
8.1.9. Facteurs influençant l'efficacité de l'extraction par solvant.....	57
8.2. Séparation et purification.....	58
8.2.1. La recristallisation.....	58
8.2.2. La chromatographie.....	59
9. Analyses structurales.....	62
9.1. Comportement chromatographique (fluorescence et facteur de retardement).....	62
9.1.1. Fluorescence sous lumière de wood.....	63
9.1.2. Effet de facteur de retardement (Rapport frontal).....	63
9. 2. Techniques spectroscopiques.....	64
9.2.1. Spectroscopie UV-Visible.....	64
9.2.2. Spectrométrie infrarouge.....	69
9.2.3. Spectrométrie de Masse (SM).....	70

9.2.4. Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N)	72
10. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique.....	75
10.1. Le couplage HPLC-UV.....	75
10.2. Le couplage HPLC-MS.....	76
10.3. Le couplage HPLC-RMN.....	77
10.4. Le couplage multidimensionnel CPC-HPLC-UV-DEDL.....	77
10.5. Le couplage CLHP-CPG-SM.....	78
10.6. Le couplage CPG-IRTF.....	78
10.7. Le couplage CPG-SM.....	78
Conclusion.....	78
Eléments des références bibliographiques.....	80

Chapitre III

Investigation botanique et ethnopharmacologique de Moricandia arvensis et Zilla macroptera..... 89

1. Aperçu botanique et ethnopharmacologique des Brassicaceae.....	90
1.1. Introduction.....	90
1.2. Caractéristiques générales.....	90
1.3. Position systématique des brassicaceaes.....	91
1.4. Principaux genres.....	91
1.5. Usages des Brassicacées.....	92
2. Monographie de la plante <i>Moricandia arvensis</i>	93
2.1. Le genre <i>Moricandia</i>	93
2.2. L'espèce <i>Moricandia arvensis</i> L.	93
2.2.1. Nomenclature botanique.....	93
2.2.2. Systématique et caractères morphologiques.....	93
2.2.3. Distribution / Habitat.....	94
2.2.4. Constitution chimique.....	94
2.2.5. Données pharmacologiques.....	94
3. Monographie de la plante <i>Zilla macroptera</i> Coss.....	95
3.1. Le genre <i>Zilla</i>	95
3.2. L'espèce <i>Zilla macroptera</i> Coss.....	95
3.2.1. Nomenclature botanique	95
3.2.2. Systématique et Caractères morphologiques.....	95
3.2.3. Distribution / Habitat	96
3.2.4. Données pharmacologiques.....	96
4. Etude ethnopharmacologique.....	96
4.1. Régions d'étude.....	96
4.2. Enquête.....	97
5. Discussions des résultats de l'enquête.....	99
5.1. Maladies traitées et parties de plantes utilisées.....	99
5.2. Usages populaires de <i>M. arvensis</i>	104
5.3. Usages populaires de <i>Z. macroptera</i>	104

Conclusion.....	106
Eléments des références bibliographiques.....	107

Chapitre IV

***Investigation phytochimique et évaluation biologique de Moricandia arvensis et Zilla macroptera*..... 110**

I-Investigation phytochimique	111
1 . Phytochimie des Brassicaceae.....	111
1.1. Les glucosinolates.....	111
1.2. Les acides organiques.....	112
1.3. Les flavonoïdes.....	113
1.4. Les terpenes, phytosterols et saponines.....	114
1.5. Les alcaloïdes.....	116
1.6. Les constituants minéraux.....	116
2. Matériel et méthodes.....	116
2.1. Etude phytochimique.....	116
2.1.1 Matériel végétal.....	116
2.1.2. Screening phytochimique.....	117
A. Produit végétal épuisé avec le HCl dilué.....	117
B. Produit végétal épuisé avec l'eau distillée.....	119
C. Produit végétal épuisé avec l'éthanol 50 %.....	121
D. Produit végétal macéré avec l'éthanol 70%.....	122
E- Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique.....	124
2.1.3. Extraction.....	124
2.1.3.1. Extraction à partir de <i>M. arvensis</i>	124
2.1.3.2. Extraction à partir de <i>Z. macroptera</i>	125
2.2. Méthodes chromatographiques analytiques.....	130
2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	130
2.2.2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	130
2.3. Les techniques d'identification structurale.....	130
2.3.1. Spectrophotométrie ultra-violet (UV).....	130
2.3.2 Spectrométrie infrarouge (IR).....	132
2.3.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	132
3. Résultats et discussions	132
3.1. Screening phytochimique.....	132
3.2. Résultats d'extraction à partir de <i>M. arvensis</i>	134
3.3. Résultats d'extraction à partir de <i>Z. macroptera</i>	147
3.4. Analyses des spectres: Remarques générales.....	156
3.4.1. Spectres UV.....	156
3.4.2. Spectres IR.....	156
3.4.3. Spectres RMN.....	159
4. Elucidation des produits isolés.....	160
4.1. Le composé Ma_1C_2	160
4.2. Le composé Ma_1C_3	162

4.3. Le composé Ma_1Ac_1	164
4.4. Le composé Ma_1Ac_2	166
4.5. Le composé Ma_2Ac_2	168
4.6. Le composé Ma_2Ac_3	170
4.7. Le composé Ma_2B_2	172
4.8. Le composé Ma_2E_1	174
4.9. Le composé Ma_2E_2	176
4.10. Le composé Zm_1C_1	179
4.11. Le composé Zm_1C_2	181
4.12. Le composé Zm_1Ac_1	183
4.13. Le composé Zm_1Ac_2	186
4.14. Le composé Zm_1Ac_3	188
4.15. Le composé Zm_1B_1	191
4.16. Le composé Zm_2Ac_1	192
4.17. Le composé Zm_2Ac_2	195
4.18. Le composé Zm_2Ac_3	196
4.19. Le composé Zm_2Ac_4	198
Conclusion	201
II- Investigation antibactérienne	205
1. Introduction.....	205
2. Tests antibactériens des extraits brutes de <i>M. arvensis</i> et <i>Z. macroptera</i>	205
2.1. Préparation des extraits.....	205
2.2. Les micro-organismes.....	205
2.3. Test antibactérien.....	206
2.4. Caractéristiques des souches utilisées.....	207
3. Résultats et discussion.....	209
4. Activités biologiques répertoriées des composés isolés.....	213
4.1. La génistéine.....	213
4.2. L'apigénine	214
4.3. La lutéoline.....	214
4.4. La quercétine	214
4.5. La taxifoline	215
5. Observation de la relation structure-activité des flavonoïdes.....	215
Conclusion	218
Eléments des références bibliographiques.....	219
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	227
<u>Annexes</u>	230
<i>Publications internationales</i>	231

INTRODUCTION GENERALE

Le temps n'est pas si lointain où l'on ne parlait pas de sa santé. Celle-ci était la condition de l'existence. On ne s'en préoccupait que lorsque le corps refusait par trop - et trop péniblement- les services qui lui étaient demandés. Il fallait être " dur au mal".

Aujourd'hui, la santé est devenue pour chacun une préoccupation majeure. Notre société, consciente des risques que comporte le mode de vie actuel, est passée du quasi-refus de la maladie au souci permanent de sa prévention [1].

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne. Laquelle en effet n'a pu trouver remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des pathogènes et à une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels. Enfin, la valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 % [2].

Certes, la médecine restera toujours, et fort heureusement à la fois un art et une forme particulière de relation directe entre deux êtres, le malade et son médecin, ce qu'aucun ouvrage ne saurait remplacer, mais, dans le même temps, elle bénéficie de plus en plus, et de manière accélérée, des acquis des autres sciences de la recherche [1].

A l'ère de la médecine moderne, des sulfamides, des antibiotiques, des hormones, des corticoïdes et autres produits de synthèse aux noms extraordinaires toujours plus nombreux, il peut encore paraître étrange à certains, de revenir sur des thérapeutiques constituées par la seule utilisation des plantes et de certains végétaux [3].

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le *métabolisme secondaire*. Celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal.

Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus...) et de corriger ses troubles métaboliques.

De nos jours, environ 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale et 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour se soigner [2-5].

On observe aujourd'hui, un grand intérêt pour l'étude des remèdes populaires et la valorisation des plantes médicinales, qui peuvent répondre au besoin du pays, pour l'inventaire des ressources médicales naturelles et pour établir une meilleure connaissance scientifique de l'usage des plantes médicinales, ce qui conduit évidemment à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques, comme le recommande chaque fois l'organisation mondiale de la santé (OMS) [6-9].

De plus, sur les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques [10]. Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, colchicine, artémisinine... Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques ; ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré [4].

L'Algérie est caractérisée par sa diversité florale: Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paleo Tropicale, estimée à plus de trois milles (3000) espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plus part spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques [11 ,12] ; ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers, ou encore un criblage systématique des espèces (criblage à haut-débit), ou toute combinaison des précédentes.

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, ethnologues etc...), le travail de phytochimiste concerne essentiellement l'isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé, et c'est dans cet axe que notre contribution peut s'inscrire.

Notre travail s'inscrit dans une perspective de valorisation et de développement de la recherche sur les plantes médicinales afin de pouvoir satisfaire au besoin de santé des populations; ceci reste une volonté des autorités sanitaires de notre pays (Algérie) suite à l'engagement de l'OMS à œuvrer dans ce domaine.

Il a été motivé par :

- la volonté de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales en Algérie et la valorisation de la médecine traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations.
- la nécessité de développer et de faciliter l'accès aux médicaments traditionnels améliorés à moindre coût compte tenu du coût élevé des médicaments conventionnels,

- l'intérêt que suscite l'étude des molécules naturelles à activité(s) biologique(s) et la connaissance des éléments chimiques des plantes afin d'améliorer leur utilisation.
- l'amélioration de la forme de présentation galénique en passant de la forme (tisane) à la forme (gélule).

Le travail de recherche qui nous a été proposé fait suite aux résultats obtenus des travaux initiés par le laboratoire de phytochimie et synthèse organique (LPSO) sur l'ethnopharmacologie, la phytochimie et la microbiologie des espèces médicinales du sud ouest algérien [13-19]. Alors les espèces médicinales de la famille des **Brassicaceae** ont retenu l'attention au cours des travaux de recherche et il était important de réunir des informations phytochimiques et biologiques sur deux plantes de la médecine traditionnelle du sud Algérien: *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*, connues respectivement sous les noms locaux " Krom Ejmel" et " Boukhlala".

Le choix de ces deux plantes a été guidé par les indications d'usage traditionnel et aussi par le fait qu'elles n'ont fait l'objet que de très peu d'investigations phytochimiques et microbiologiques.

L'étude des plantes médicinales peut être abordée de trois manières différentes :

- par l'inventaire systématique de toute flore d'une région ou d'un pays.
- par l'enquête ethno-botanique, permettant de sélectionner les plantes utilisées en médecine populaire,
- par la phytochimie ou analyse chimique de certaines familles renfermant des substances douées de pouvoir thérapeutique confirmé.

Les principales parties de ce travail sont traitées selon le plan suivant :

- Une première partie, bibliographique, comportant deux chapitres dont le premier est consacré pour l'essentiel à une mise au point sur les connaissances actuelles sur l'intérêt des plantes médicinales ainsi que la chimie et les activités des substances naturelles. Nous présentons ensuite, dans le deuxième chapitre, un aperçu général sur les flavonoides.
- Une deuxième partie, expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels, comporte un troisième chapitre, portant cette fois sur l'étude ethnopharmacologique et botanique de nos deux espèces cibles: *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*. Le quatrième et dernier chapitre concerne les résultats de l'étude phytochimique et des tests antibactériens sur les extraits par différents solvants ainsi que l'étude de la relation entre la structure et l'activité (SAR) de quelques composés isolés.

Eléments de références bibliographiques

- [1] Petit Larousse de la médecine, **2002**. Larousse, VUEF.
- [2] Segnou, Fatakun C.A, Akoroda, M., Hahn, S. **1992**. "Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*)". *Euphytica*. 64(3):197.
- [3] Cordell G.A. **2001**. "Plants and drugs discovery- a future perspective. Proceedings of the international symposium on man and nature". Osaka, Japan
- [4] Akoroda M. **1981**. "Studies of the genetics and floral biology of yam (*Dioscorea rotundata* and *D. cayanensis*)". Dept. of agronomy. Univ of Ibadan. 298.
- [5] Aighewi B.A., Akoroda, M., Asiedu, R. **1998**. "preliminary studies of seed yam production from minisets with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*)", 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi), 22-28 Oct.
- [6] Cheriti A. **2000**. "Plantes médicinales de la région de Bechar, Sud-ouest Algérien: étude ethnopharmacologique", Rapport CRSTRA, Algérie.
- [7] Berghioua A., Cheriti A. & Belboukhari A. **2009**. "Antimicrobial evaluation of different crude extracts from *Moricandia arvensis*". *Phytochemistry & Bioactive substances conference*. Bechar
- [8] Cheriti A. **2009**. "L'ethnopharmacologie en Algérie: entre héritage et valorisation". *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar 04-05 decembre .
- [9] Berregioua A. et Cheriti A. **2011**. "Ethnopharmacologie et Screening phytochimique de deux Brassicaceae du Sud Ouest Algérien". *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar, 04 - 05 Decembre.
- [10] Verpoorte R. **2002**. "La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. des sources du savoir aux médicaments du futur", 4^e congrès européen d'ethnopharmacologie. IRD Edition, Paris, 274 p.
- [11] Ozenda P. **1977**. "Flore du Sahara", Ed. CNRS, Paris, France, 250-259,
- [12] Gaussen H. et Leroy H. F. **1982**. "Précis de botanique, végétaux supérieurs", 2eme Ed., 426.
- [13] Belboukhari N., Cheriti A., Djaafri A. and Roussel C. **2008**. "Synthesis and Identification of Some Derivatives of 4,5-Dimethyl-D4-N-aryl-N-ethylimidazoline-2-thione". *Asian Journal of Chemistry*, 20(4): 2491-2496.
- [14] Belboukhari N. and Cheriti A. **2008**. "Antibacterial Investigation of the Medicinal Plant *Launaea naudiculis*". *Electronic Journal of Environmental, Agronomy and Food Chemistry*, 7(14): 2749-2753.
- [15] Belboukhari N. and Cheriti A. **2007**. "Flavonoids of *Limoniastrum feei*". *Research Journal of Phytochemistry*, 1(2): 74-78.
- [20] Belboukhari N. and Cheriti A. **2006**. "Phytochemical Investigation of the Bioactive Extract from *Launaea arborescens*". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (15): 2930-2932.
- [16] Belboukhari N. and Cheriti A. **2006**. "Antibacterial and Antifungal Activities of Crude Extracts from *Launaea arborescens*". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(1):1-2.
- [17] Cheriti A., Belboukhari N. and Hacini S. **2005**. "Savoir Traditionnel et Valorisation des Plantes Médicinales du Sud-Ouest algérien". *Annales de l'Université de Béchar*, 1:4.

[18] Cheriti A., Belboukhari N. and Hacini S. **2004**. "Ethnopharmacological Survey and Phytochemical Screening of Some Medicinal Plants of Algerian Sahara". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 51.

[19] Cheriti A. **2000**. "Plantes Médicinales de la Région de Béchar, Sud-ouest d'Algérie (Ethnopharmacological studies), Rapport CRSTA, Bechar, Algeria, 3-11.

CHAPITRE I

PLANTES MEDICINALES : USAGES ET CHIMIE

1. Historique

Dès son existence, l'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que de la nourriture. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être[1]. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av. J.C.) qui voient l'essor de l'agriculture et la sédentarisation [1].

L'utilisation correcte des plantes dans des buts médicaux exige de bien se documenter en vue de l'identification correcte des plantes et de la confirmation de leurs propriétés.

Le premier livre de matière médicale, le Shen Nung Ben Cao jing ("Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung"), fut rédigé vers 2900 avant J.-C. Ce livre contenait la liste de trois cent soixante-cinq remèdes, par analogie avec les jours de l'année, et se divisait en trois parties [1] :

-120 drogues inoffensives, toniques, conservant la santé, conférant résistance et longévité;

-120 drogues thérapeutiques à donner aux malades, les unes sans danger, les autres douées d'une certaine toxicité;

-125 drogues vénéneuses, à n'utiliser qu'avec de grandes précautions.

Tous ces médicaments étaient d'origine végétale et étaient répartis dans chaque catégorie en herbes, arbres, fruits, graines et légumes. Plus tard, un supplément fut ajouté à l'ouvrage, avec une liste d'autres remèdes, minéraux et animaux.

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5^e siècle av. J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs). Hippocrate jeta les bases de la médecine scientifique, cherchant aux maladies une explication rationnelle et non plus magique [2].

A l'époque de la civilisation arabo-musulmane (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), la pharmacologie a connu un grand essor, ainsi différentes techniques en médecine, en pharmacie, en botanique médicale ont été développés et beaucoup de livres ont été traduits du grec, du latin et du perse [3].

Parmi les musulmans qui ont largement opéré ces traductions, qui sont en nombre de 230 manuscrits, il faut citer *Abou Bakr Mohamed Ibn Zakaria El Razi* (865-925), parmi ses écrits les plus importants il y a le livre "El Haoui" (Le contenant) qui fut un récapitulatif de toutes les connaissances depuis Hippocrate. Après *El Razi*, le plus célèbre des médecins musulmans est *Abu Ali Ibn Sina* (980-1037), qui dès l'âge de 17 ans s'adonna à la médecine, et il écrivit son célèbre livre intitulé "El Kanoun fi Tib", traduit partout dans le monde et utilisé comme référence jusqu'à

nos jours. Mais le plus grand d'entre eux fut sans aucun doute *Ibn al Baytar* (1197-1248). Né à Malaga, il émigra en Orient où il rédigea le très complet "al jami'a li mofradet el adwiya (traité des Simples)", ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont 300 plantes citées pour la première fois [2,4].

Ce sont les Arabes qui donnèrent à la pharmacie son caractère scientifique. Les traditions pharmaceutiques arabes passèrent en Europe et influencèrent profondément les grandes universités de l'époque du 9^e siècle [2].

L'Algérie couvre une surface de 2.381.741 km² ; c'est le plus grand pays d'Afrique. Deux chaînes montagneuses importantes, l'Atlas Tellien au Nord et l'Atlas Saharien au Sud, séparent le pays en trois types de milieu qui se distinguent par leur relief et leur morphologie, donnant lieu à une importante diversité biologique. Les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif [5].

En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de loin. Elles ont eu une grande influence et occupé une place importante dans la vie quotidienne des algériens, on peut observer cette influence même sur les timbres postaux [6].



Fig.1.1. Timbres d'Algérie illustrant quelques plantes [6]

Nous citerons parmi les derniers médecins arabes du 17^{ème} siècle *AbdelRazak Ibn Hamadouche El Djazairi* (1695-1785). Parmi les ouvrages qu'il a écrit, on peut citer : "Lissane el makale fi ennabaa ani ennassab ouel hassab ouel hâl", "Errihla" (le voyage), "Kechf erroumouz", où l'on peut noter sa parfaite connaissance des plantes médicinales de l'époque, "Taâdil el mizadj bi sababi kaouanine el ilaâdj" (modération du tempérament par les lois du traitement), qui a été traduit par L. Leclerc et

surtout, l'ouvrage en quatre tomes : "El jawhar el maknoun min bahr el kanoun" où il traite des poisons, des maladies et des plantes et drogues médicinales[7].

Même pendant le colonialisme français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par Fourment et Roques où ils ont mentionné, décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara [8].

2. Utilisation des plantes médicinales

A l'ère préhistorique lorsque les hommes vivaient de la chasse et de la cueillette, la nourriture était souvent synonyme de remède. Les plantes étaient cueillies en fonction des besoins. Ceux en énergie, hydrate de carbone et protéines, étaient quotidiens. D'autres étaient occasionnels : antiseptiques hémostatiques pour une blessure, ou astringents contre la diarrhée [9].

L'usage des plantes est très souvent explicité conformément à l'antique théorie des signatures. Selon cette conception thérapeutique, les plantes, par leurs formes, leurs couleurs ou d'autres caractères, signent la nature des organes qu'elles sont aptes à soigner. En effet, pour *Dioscoride* (Ier siècle ap. J.-C.), puis *Paracelse* qui donna à cette théorie une grande notoriété, Allah donna à l'homme des remèdes qu'Il avait placés dans les végétaux. Pour les identifier, l'homme devait alors observer leur morphologie, car elle renfermait l'indice de leur utilisation. Ainsi, la pulmonaire, dont les feuilles allongées tachées de blanc rappelaient les lobes des poumons, était donc toute indiquée dans les affections respiratoires ou la colchique, avec son bulbe en forme de gros orteil, ne pouvait être destinée qu'au traitement de la goutte. C'était là un raisonnement quelque peu simpliste, qu'affirme que les semblables soignent les semblables, et qui reste une des théories fondamentales de l'homéopathie moderne [10,11].

Il est acquis que les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, ou d'en prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou infections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien [12-14].

Des propriétés ont ainsi été mises en évidence par l'expérience et ne se sont jamais trouvées démenties par l'usage. Les indications qui en découlent ont fait leur preuve pratique. Elles sont reproductibles et sont reconnues par la plupart des pharmacopées [12-14].

Exemple: Les propriétés retenues de l'usage de l'ail (*Allium sativum*) sont tonique, anti-infectieux, hypotenseur...

Les insuffisances et oublis de l'approche traditionnelle ont conduit à l'étude nécessaire de la plante médicinale à un niveau scientifique et pharmacologique [15-17].

À ce niveau, les propriétés de la plante médicinale ont fait l'objet de démonstrations expérimentales *in vitro* ou *in vivo*, chez l'animal et/ou chez l'homme. Ces études démontrent l'activité et les propriétés des extraits totaux de la plante ou de certains de ses constituants appelés principes actifs, confirment ou infirment les données issues de la tradition et permettent une utilisation de la plante médicinale suivant des critères pharmacologiques précis, sortant alors des imprécisions et redites infondées...

Exemple: Les propriétés confirmées expérimentalement de l'ail (*Allium sativum*) sont anti-infectieux, sympatholytique, anti-athéromateux, anti-agrégante plaquettaire, diurétique.

Les problèmes se posent à plusieurs niveaux: La multiplicité et la complexité des constituants de la plante médicinale, l'obtention de résultats paradoxaux: exemple de l'artichaut (*Cynara scolymus*) dans le quel sont présents les acides chlorogénique, malique, citrique et succinique; aucun de ces acides pris isolément n'a de propriété pharmacologique, alors que l'ensemble des acides possède des propriétés cholérétiques et diurétiques (synergie), potentialisé par les autres constituants de la plante[18,19].

On assiste chaque année à la naissance de nouveaux médicaments, obtenus de la nature ou par synthèse:

- **Origine naturelle** : citons entre autres des alcaloïdes comme la *morphine* à propriétés analgésiques, l'*ergotamine* efficace contre les migraines, la *vinblastine* et la *vincristine*, efficaces contre la leucémie, la *vincamine* qui améliore la circulation cérébrale ; les hétérosides comme la *digitaline* et la *digoxine* qui traitent les insuffisances cardiaques chroniques. La découverte de ces substances a eu un retentissement particulièrement important [20].

- **Origine synthétique** : les principes actifs des végétaux inspirent la préparation des médicaments de synthèse. Ainsi, la structure de l'*aspirine* (acide acétylsalicylique) est voisine de celle de la *salicine* des écorces de saule, de même pour les anticoagulants, les anesthésiques locaux, les antimalariques (contre la malaria) et les curarisants (paralysant les muscles) de synthèse[20].

- **Origine hémisynthétique** : les plantes fournissent des précurseurs pour la préparation de médicaments. Par exemple, on trouve chez des végétaux comme le *Dioscorea*, le *Fénu-grec* et certaines *Agaves*, des stéroïdes, inactifs par eux-mêmes, mais dont le chimiste peut modifier la structure pour fabriquer des hormones sexuelles et cortico-surréaliennes [20].

Le mode de préparation d'un produit phytothérapeutique peut avoir un effet sur la quantité d'ingrédient actif présent. Le moment et la saison de la récolte de la plante, ainsi que le type de sol où elle pousse, peuvent également influencer son efficacité[14].

Tab.1.1. *Quelques formes galéniques utilisées* [14]

préparation	Mode
<i>Décoction</i>	bouillir les plantes de 10 à 30 mn, le plus souvent dans de l'eau.
<i>Infusion</i>	verser de l'eau bouillante sur les plantes (ou encore à jeter les plantes dans le récipient contenant l'eau bouillante) au moment précis où l'eau entre en ébullition.
<i>Macération</i>	mettre les plantes en contact, à froid, avec un liquide quelconque. Les macérations à l'eau ont l'inconvénient de fermenter facilement, ne doivent pas, de toute manière, excéder une dizaine d'heures.
<i>Cataplasme</i>	Préparer la plante assez pâteuse pour être appliquée sur la peau
<i>Compresse</i>	appliquer durablement une gaze ou d'un linge, imbibée de la préparation, sur la partie du corps à soigner
<i>Teinture alcoolique</i>	dissoudre dans de l'alcool des substances médicamenteuses.
<i>Gargarisme</i>	Préparer un liquide dont on se rince la bouche, la gorge, le pharynx, les amygdales et les muqueuses
<i>Poudre</i>	elle est obtenue par broyage de l'organe desséché puis tamisé
<i>Tisane</i>	avec des plantes fraîches ou avec des plantes séchées

3. Chimie des plantes

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories : Les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

3.1. Molécules issues du métabolisme primaire : Ce sont des composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres [21].

3.1.1. Les glucides : Les glucides sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes: polymères énergétiques (amidon) ou structuraux (cellulose, pectines...), sucres simples et hétérosides [21].

3.1.2. Les acides aminés et organiques : Ces métabolites primaires polaires sont présents dans différentes parties des plantes [22, 23]. Les fruits et le jus d'argousier contiennent dix-huit acides aminés dont les plus abondants sont l'acide aspartique, la proline et la thréonine [22]. Des acides organiques sont également présents tels que l'acide malique(A), l'acide quinique (B) et l'acide citrique(C) [22].

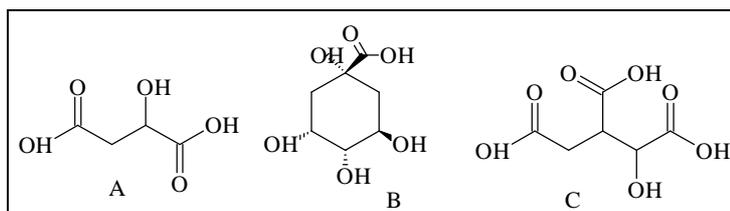


Fig.1.2. Structures de quelques acides organiques isolés d'argousier

3.1.3. *Les lipides* [24] : Les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont des molécules à caractère hydrophobe (à solubilité nulle ou faible dans l'eau) et solubles dans des solvants organiques.

3.1.3.1. *Les lipides vrais* : Ils résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par liaison ester ou amide.

a/ *Les acides gras* : Les acides gras sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras).

a.1. *Les acides gras saturés* : De formule générale $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$, chaque acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, fortement apolaire et un groupement carboxyle polaire. Exemple : l'acide palmitique en C16 de formule $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$

a.2. *Les acides gras insaturés* : Ils présentent dans leur molécule une ou plusieurs doubles liaisons. La présence de ces doubles liaisons leur confère des propriétés physico-chimiques particulières. Exemple: l'acide oléique en C18 possède une double liaison en position 9.

a.3. *Les acides gras atypiques* : Des acides gras à nombre impair de carbones, ou des acides avec des modifications de la chaîne carbonée portant sur l'insaturation, ou ayant subi des substitutions ou des cyclisations.

b. *Les lipides simples* : Les lipides simples, encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool :

- acylglycérols (ou glycérides) : sont des esters du glycérol,
- cérides : sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras),
- stérides : sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

3.2. Molécules issues du métabolisme secondaire : Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Les métabolites secondaires à structures chimiques souvent complexes, sont très dispersés et très différents selon les espèces. C'est seulement à partir de la

deuxième moitié du 20^e siècle qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse [21,25].

3.2.1. *Les composés phénoliques* : Ce sont des composés dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques, qui dérivent de la biogenèse de l'acide chikimique et/ou l'acétate et qui ne contiennent pas de l'azote [26].

Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage [27].

Parmi les composés phénoliques; les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthonés, les coumarines et d'autres classes existent en nombres considérables [28].

Tab.I.2 : Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes [28]

nombre d'atomes de carbone	squelette de base	classe
6	C6	phénols simples, benzoquinones
7	C6 - C1	acides phénoliques
8	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique
9	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 - C4	naphthoquinone
13	C6 - C1 - C6	xanthone
14	C6 - C2 - C6	stilbène, anthraquinone
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 - C3) 2	lignanes, neolignanes
30	(C6 - C3 - C6) 2	biflavonoïdes
n	(C6 - C3) n	lignanes
	(C6) n	catecholmelanine
	(C6 - C3 - C6) n	(tanins condensés)

3.2.1.1. *Les flavonoïdes* : Les flavonoïdes sont présents dans plusieurs plantes, notamment dans les fruits et les légumes. Ils sont également présents dans le thé, les céréales, les épices et les herbes aromatiques [29-32] (voir chap.II pour plus de détails).

3.2.1.2. *Les tanins* : On distingue différentes classes de tanins (figure 1. 3):

-Les tanins hydrolysables : ce sont des hétérosides polyphénoliques issus de la combinaison d'un sucre estérifié par un nombre variable de molécules d'acides phénoliques (acide gallique, acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés).

-Les tanins condensés : encore appelés proanthocyanidols (car ils conduisent en milieu acide et à

chaud à des anthocyanidols), ce sont les tanins catéchiques, oligomères et polymères d'aglycones polyphénols flavaniques (unités flavan-3-ols), non hydrolysables [33].

La propriété tannante résulte de la formation de liaisons des tanins au collagène de la peau. De la même manière, les tanins se combinent à des macromolécules comme la cellulose, les protéines, les pectines et les précipitent. Il s'agit d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène entre les groupements phénoliques des tanins et les autres polymères [33,34].

Les préparations à base de drogues riches en tanins sont employées le plus souvent extérieurement contre les inflammations de la cavité buccale, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive [34]. En usage interne, elles sont utiles en cas de catarrhe intestinal, de diarrhée, d'affections de la vésicule, ainsi que comme antidote (contre-poison) lors d'empoisonnements par des alcaloïdes végétaux [34].

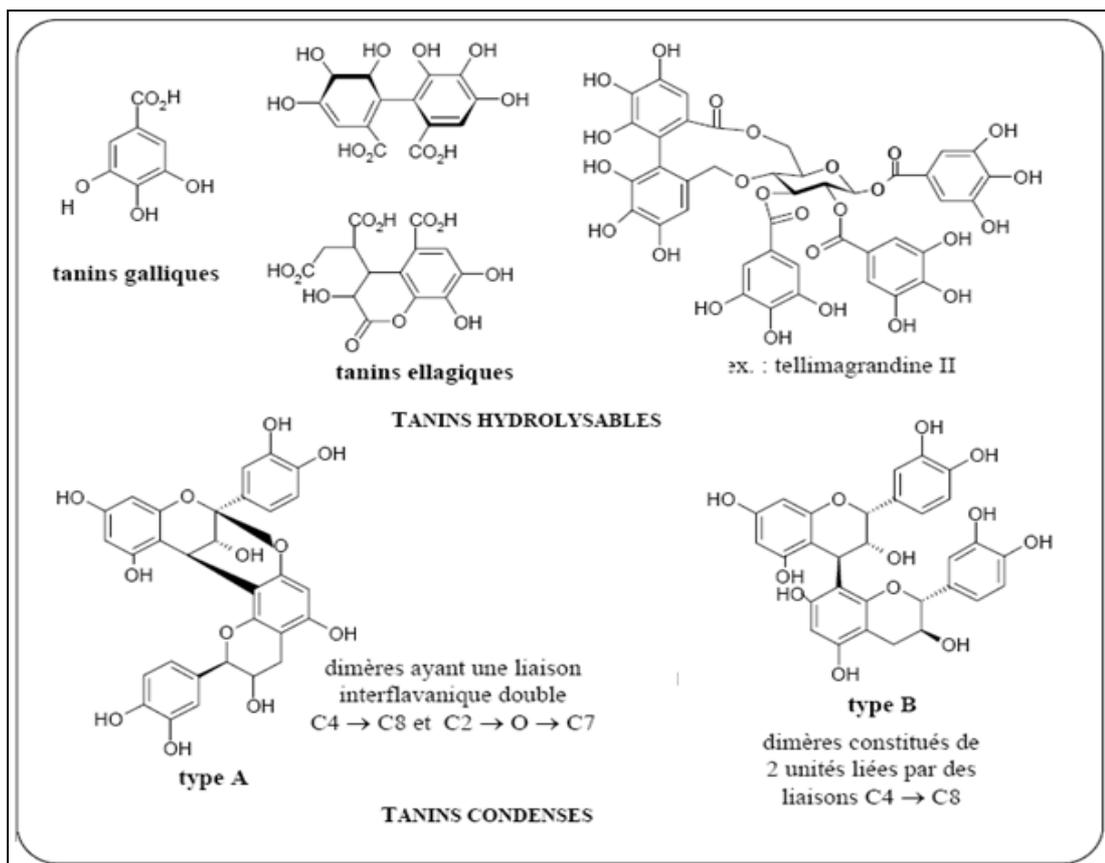


Fig.1.3 : Structures des tanins hydrolysables et condensés [33].

3.2.1.3. *Les coumarines* : Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka, d'où fut isolée pour la première fois en 1820 la coumarine [33]. Les coumarines sont des

2H-1-benzopyran-2-ones, que l'on peut considérer en première approximation, comme étant des lactones des acides 2- hydroxy-Z- Cinnamiques.

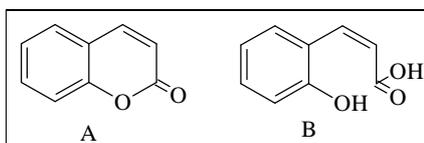


Fig.1.4. Structure de coumarine(A) et d'acide 2- hydroxy-Z- Cinnamique(B)

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes [35,36]. Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane, telles que l'activité antifongique, anti-tumorale, antiagrégation plaquettaire, inhibitrice de plusieurs enzymes, antivirale, anti-inflammatoire, anticoagulante, diurétique et analgésique [37]. L'esculine, contenue dans l'écorce du marron d'Inde a les mêmes effets que la vitamine P, elle augmente la résistance des vaisseaux sanguins et présente donc un intérêt pour les soins des hémorroïdes et des varices. De plus, elle absorbe les rayons ultraviolets (filtres solaires, crèmes protectrices) [37].

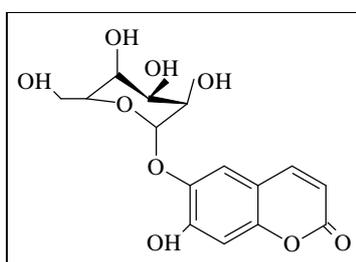


Fig.1.5. Structure d'esculine

3.2.1.4. Les lignanes : Le terme lignane désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phényl propane (liaison 8-8') [38].

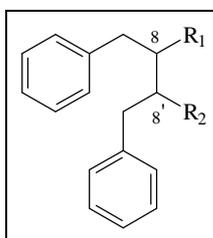


Fig.1.6. Squelette de base de lignanes

Plusieurs centaines de lignanes ont été isolées [39]. Ils possèdent des activités biologiques, antitumorales et anti-œstrogéniques. Ce sont également des inhibiteurs des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones sexuelles [40].

3.2.1.5. *Les acides phénoliques*: Ils possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique et sont dérivés des acides benzoïques (C6-C1) ou des acides cinnamiques (C6-C3). Ce sont aussi les constituants à peu près constants des végétaux. Ils agissent comme laxatifs légers.

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

La gaulthérie (*Gaultheria procumbens*) et le saule blanc (*Salix alba*) contiennent des acides glucosides phénoliques qui donnent, par distillation, des dérivés de salicylique et de salicylate de méthyle [33,34].

3.2.2. *Les alcaloïdes* : Le terme d'alcaloïde (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect) a été introduit par W. Meisner au début du XIXe siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des « alcalis ». Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels [33].

Les alcaloïdes renferment un atome d'azote dans la structure qui les rend pharmaceutiquement très actifs. C'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea* syn. *Catharanthus roseus*) employé pour traiter certains types de cancer [33,34].

Les alcaloïdes sont utilisés comme analgésiques majeurs (morphine), antipaludiques (quinine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme substances paralysantes (curare, caféine), comme poisons (strychnine, nicotine), comme stupéfiants (cocaïne, mescaline), comme cholinergiques (pilocarpine) ou comme anticancéreux (vinblastine, vincristine). D'autres alcaloïdes, comme l'atropine, présentent une activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) [27].

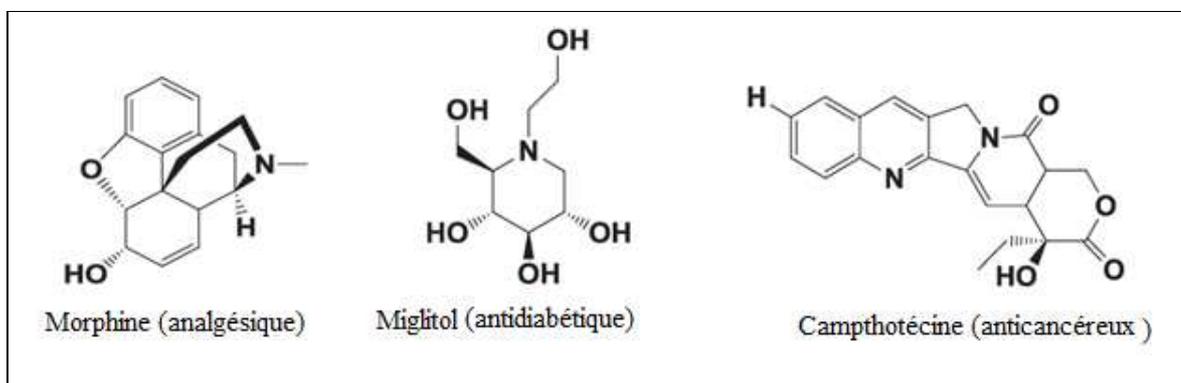
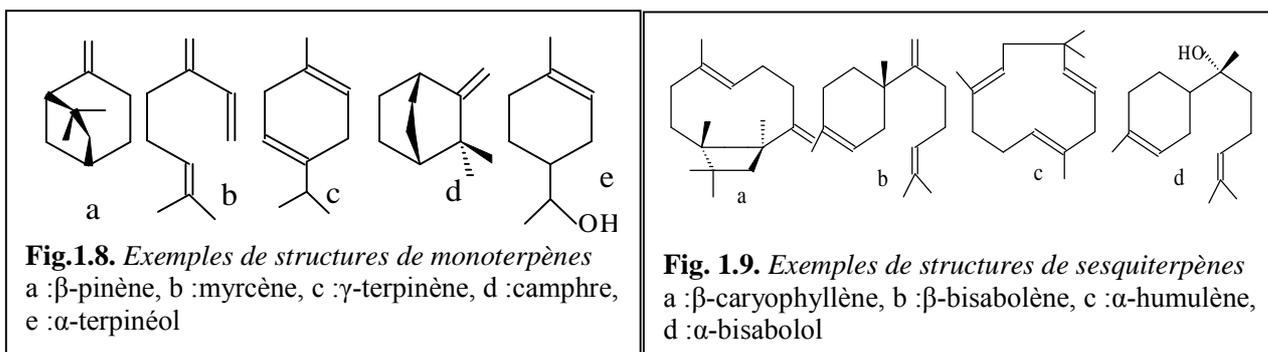


Fig.1.7. Structures de quelques alcaloïdes

3.2.3. *Les huiles essentielles* : Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Elles sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols et d'autres éléments qui ne sont pas tous encore analysés. Seules les huiles essentielles naturelles ont des propriétés thérapeutiques [27, 33,34].



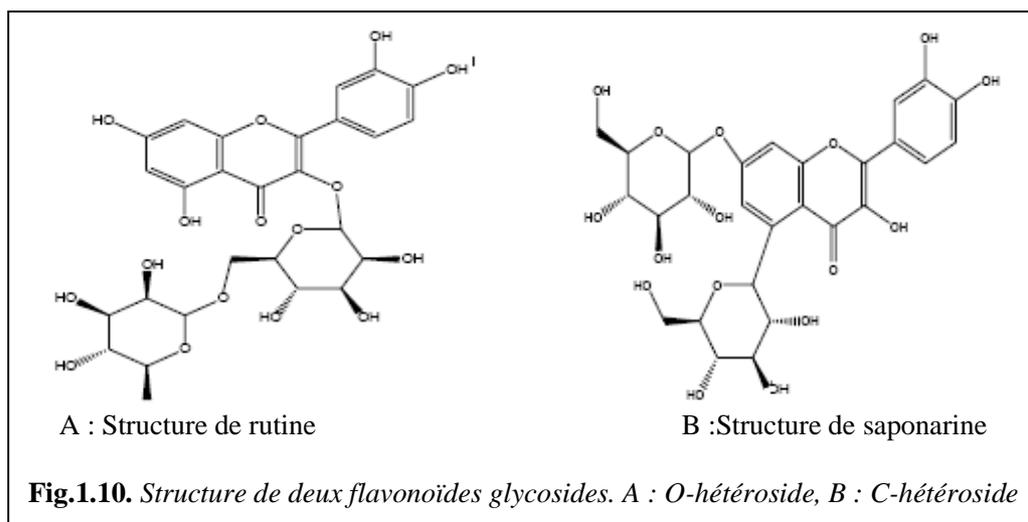
Parmi la foule d'essences naturelles qui entrent dans la composition de nombreux remèdes naturels, citons l'essence d'anis (*Oleum anisi*), de fenouil (*Oleum foeniculi*), de lavande (*Oleum levandulae*), de menthe poivrée (*Oleum menthae*) et le menthol qu'elle fournit, ainsi que son carvacrol qui est un excellent désinfectant. L'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), par exemple, est fortement antiseptique [27, 33, 34].

La pharmacologie regroupe sous le nom de principes amers des substances végétales terpéniques susceptibles de libérer de l'azulène, ainsi que des glucosides de diverses structures biochimiques [16,33]. Comme leur nom l'indique, les substances amères sont divers composés qui ont un goût amer très prononcé. Ces substances stimulent les glandes salivaires et les organes digestifs. Elles augmentent l'appétit et facilitent la digestion (stomachique, apéritif, tonique).

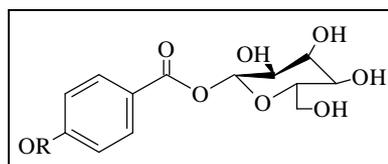
3.2.4. *Les huiles grasses* : Il s'agit d'huiles végétales liquides à température ambiante. Le froid les trouble et les fait figer, elles sont insolubles dans l'eau, mais bien solubles dans les solvants organiques (chloroforme, acétone, par exemple) [34].

Parmi les huiles non siccatives, on peut citer l'huile d'olive et l'huile d'amandes, parmi les semisiccatives, celle d'arachide, de tournesol et de colza. L'huile de lin et d'œillette sont siccatives. L'huile de ricin est fortement laxative. Les huiles grasses sont couramment utilisées, tant pour la fabrication de remèdes qu'à des fins alimentaires et industrielles [34].

3.2.5 *Les hétérosides ou glycosides*: Les hétérosides, autrefois désignés sous le nom de glycosides, sont des corps, soit synthétiques, soit naturels. On trouve dans les hétérosides naturels une très grande variété d'osés: glucose, galactose, rhamnose, quinovose, xylose, arabinose, ribose, etc., La liaison genine-ose donne des O-hétérosides (Rutine) ou des C- hétérosides (Saponarine). Les C-hétérosides semblent intéressants en thérapeutique. La rupture de la liaison genine-ose est plus difficile dans le cas des C-hétérosides que dans celui des O-hétérosides [27].



Les hétérosides présentent tous le caractère commun de se décomposer sous l'influence des acides forts ou des ferments (les carbohydrases) pour donner naissance à un ou plusieurs sucres (oses) et une partie non glucidique appelée aglycone. Cette dernière partie détermine l'effet thérapeutique. On pourra, pour chaque hétéroside, déterminer deux formes stéréo-isomères α ou β suivant les deux formes correspondantes des oses entrant dans leur constitution [27].



R=H: β -glucopyranosyl 4-hydroxybenzoate
R=Glu: β -glucopyranosyl 4-O- β -glucopyranosylbenzoate

Fig.1.11. structures de quelques glycosides isolés à partir des fleurs de *Moricandia arvensis* [41].

Selon leur composition chimique, on distingue plusieurs groupes de glycosides :

3.2.5.1. *Les saponines* : Toutes les saponines sont fortement moussantes et constituent d'excellents émulsifiants (en latin, *sapo* signifie savon) [42].

Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdes à partir des quels on synthétisa la pilule contraceptive. Les saponines triterpénoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments. [33,42].

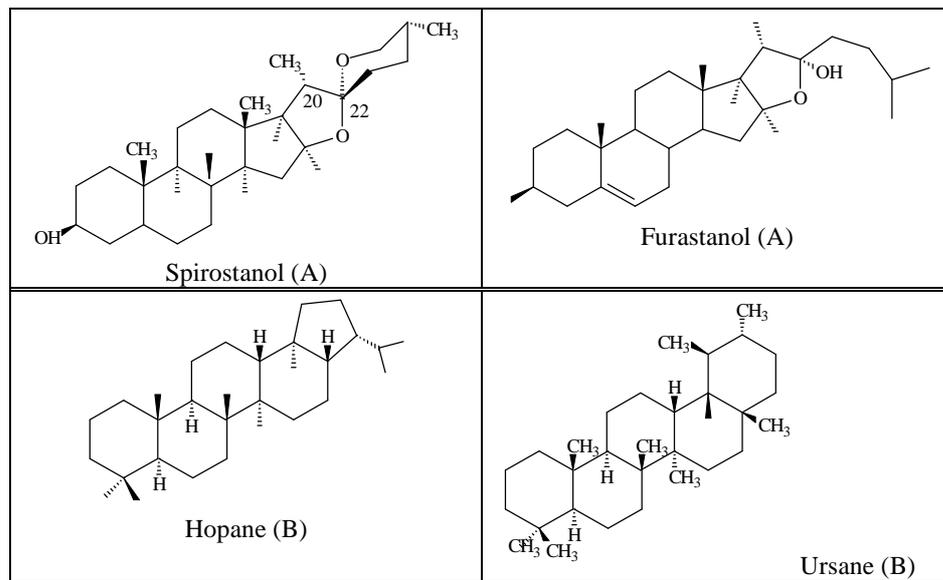


Fig.1.12. Squelette de base des saponines (A): à génine stéroïdique (B): à génine triterpénoïde

Les saponines ont la propriété d'hémolyser les globules rouges, ce qui explique l'effet toxique de certaines d'entre elles à l'égard des animaux à sang froid, surtout les poissons [33]. Les saponines causent un relâchement intestinal, augmentent les sécrétions muqueuses bronchiales et désinfectent les voies urinaires. Elles sont employées comme diurétiques et elles possèdent des propriétés cytotoxiques et antitumorales [33]. Les saponines sont aussi connues par leur activité antifongique, comme la dioscine (figure 1.13) trouvée dans certains légumes. Celles à génine stéroïdique sont des fongicides plus efficaces que celles à génine triterpénoïde [43].

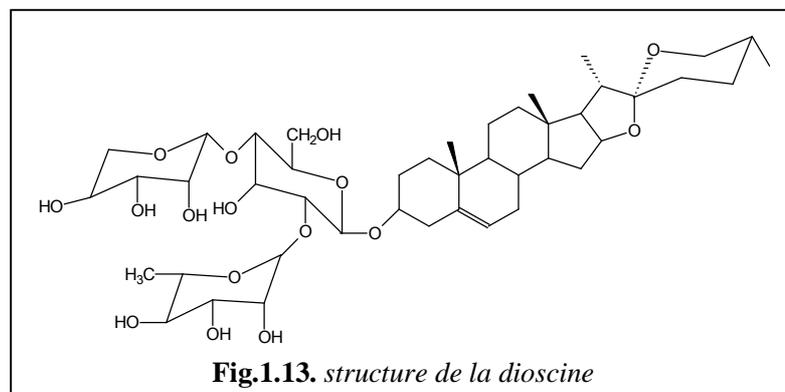


Fig.1.13. structure de la dioscine

3.2.5.2. *Les hétérosides cardiotoniques* : On retrouve les hétérosides cardiotoniques dans de nombreuses plantes médicinales, telles que la digitale laineuse (*Digitalis lanata*) et pourprée (*D. purpurea*) et le muguet (*Convallaria majalis*). Selon leurs structures chimiques, on les divise en cardénolides et en bufadiénols. Ces substances (comme la digitoxine, la digoxine et la convallotoxine) ont une action directe sur le cœur (régulant l'activité cardiaque à des doses infinitésimales en cas d'affaiblissement de ce dernier) [44]. Chez les individus non atteints de cardiopathies, elles sont dangereuses. Leur consommation peut être fatale pour l'homme et les animaux. Les glucosides cardiaques ont aussi des propriétés diurétiques [33,34].

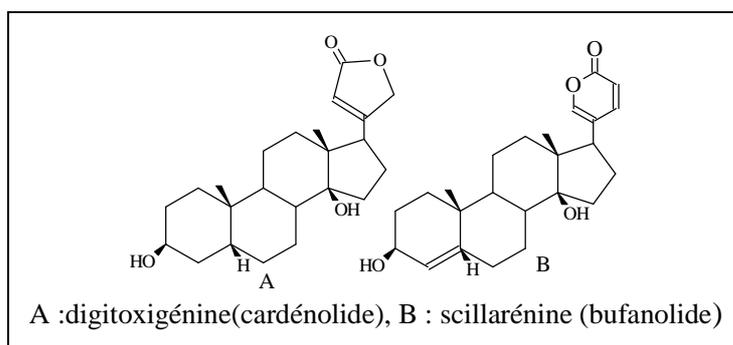


Fig.1.14. Hétérosides cardiotoniques.

3.2.5.3. *Les hétérosides anthraquinoniques* : Ces glycosides sont le plus souvent des pigments cristallins, facilement labiles. Ce sont de puissants laxatifs et purgatifs. Rencontrés dans les taxons tels : Polygonaceae et Rhamnaceae. Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*) [33,34].

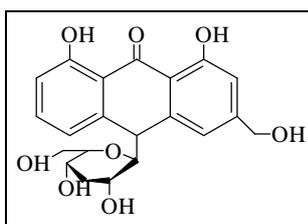


Fig.1.15 : Exemple de drogues à hétérosides anthracéniques (aloïne)

3.2.5.4. *Les hétérosides cyanogéniques* : Molécules liées à un sucre et susceptibles de libérer HCN par hydrolyse. Il s'agit de substances à base de cyanure, mais qui à petites doses ont un effet sédatif sur le système nerveux (muscles, cœur). L'écorce du *Prunus serotina* (cerisier sauvage), les noyaux de fruits de *Prunus armeniaca* (l'abricotier) et les feuilles du *Sambucus nigra* (sureau noir), (les trois parties contiennent les cyanogènes), permettent de supprimer ou de calmer les toux sèches et irritantes.

L'action enzymatique les décompose (souvent dans la salive humaine) en acide cyanhydrique libre ce qui donne le goût et l'odeur d'amande amère [33,34].

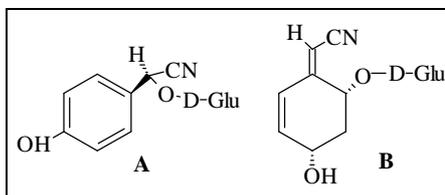


Fig.1.16 : Exemples de drogues à hétérosides cyanogènes :
(*S*)-Dhurrine (A), Ménisdaurine (B)

3.2.5.5. *Les glucosinolates* : Les glucosinolates sont présents dans toutes les espèces de Brassicaceae [45], le radis (*Raphanus sativus*) et le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) sont des plantes à glucosinolates typiques[33,34]. On les rencontre également dans d'autres familles telles que les Capparidaceae et Moringaceae. Les glucosinolates (GLC) sont des hétérosides soufrés, anioniques, responsables des odeurs fortes dégagées par les Brassicaceae [33]. La structure de base des glucosinolates comporte un glucose (Glu), un groupe sulfate et une génine variable (R). La molécule existe généralement sous la forme de sels de potassium [46,47].

Certains auteurs considèrent ces molécules utiles, non seulement pour leur activité contre les bactéries, les champignons, nématodes mais aussi sur la croissance des cellules de tumeur et dans la prévention du cancer [33,48- 51].

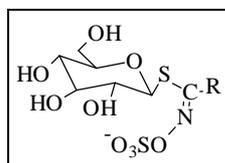


Fig.1.17. Structure de base des glucosinolates

3.2.6. *Les phytosterols*: Les stérols sont des stéroïdes comprenant au moins un groupement hydroxyle (OH) dans la plupart des cas sur le carbone 3[52,53], leur structure est très semblable à celle du cholestérol ou de ses homologues.

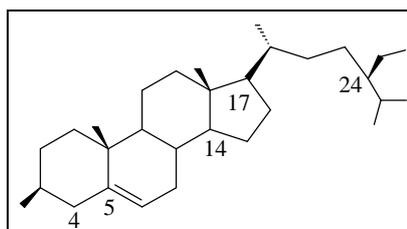


Fig.1.18. Structure de sitostérol (Δ^5)

Les phytosterols (sterols végétaux) se diffèrent des autres stérols par une modification dans la chaîne latérale R, qui peut comporter un groupement méthyle ou éthyle fixé sur le carbone C24 et dans des cas, une double liaison supplémentaire en C22 [54,55]. Les glycosides des stérols sont les stérolines [56].

Les phytostérols sont étudiés en raison de leurs diversités structurales, de leur très faible toxicité et de leurs activités pharmacologiques telles que: anti-cholestérolémique, antidiabétique, antiinflammatoire, antitumorale, antinéoplasique et anticancéreuse[57,58].

3.2.7. Les Polysaccharides (mucilages, gommés, résines, latex) : Ce sont des polymères constitués de plusieurs oses liés ensemble par des liaisons O-sidiques. Du point de vue phytothérapeutique, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages et les gommés [33,34]. Les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) et le lin (*linum usitatissimum*), sont utilisées contre les inflammations des muqueuses, notamment celles des voies respiratoires et digestives, elles assouplissent la peau lors d'applications de cataplasmes.

Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines, sont utilisés en cosmétologie.

3.2.8. Les vitamines : Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être fournies par l'alimentation. Treize substances répondent à cette définition. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire [59].

Certaines d'entre elles ont des structures proches de celles d'autres composés organiques : sucres pour la vitamine C, hormones stéroïdes pour la vitamine D, porphyrines pour la vitamine B12.

Les plantes fournissent quasiment toutes les vitamines. Certaines plantes en sont riches (ex: Citron (*Citrus limon*): vitamine C; Carottes (*Daucus carota*): provitamines A (β -carotène); Cresson (*Nasturtium officinale*): vitamines B1, B2, C, E) [59].

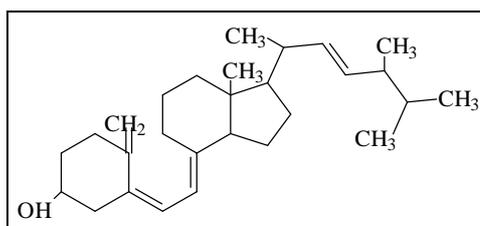


Fig.1.19. Structure de vitamine D2 (d'origine végétale)

3.2.9. *Les constituants minéraux* : Les sels de potassium (K) et de calcium (Ca) sont particulièrement importants comme constituants de l'organisme; les sels de potassium jouissent en plus des propriétés diurétiques, tandis que les sels de calcium participent à l'élaboration du système osseux, à la régulation du système nerveux et à la résistance aux maladies infectieuses.

Dans de nombreux cas, les minéraux contenus dans une plante participent activement à son activité thérapeutique dans l'organisme. La prêle (*Equisetum arvense*), grâce à sa forte teneur en silice, est efficace contre l'arthrite, contribuant à réparer le tissu conjonctif alors que le pissenlit (*Taraxacum officinale*) est un puissant diurétique, effet dû à sa concentration en potassium [27,33]

Tab.1.3 : Récapitulatif des éléments actifs des plantes[34,60]

Composants chimiques	Propriété(s)
Alcaloïdes	Antidouleurs, réduisent les spasmes (antispasmodiques)
Anthocyaniques	Maintiennent les vaisseaux sanguins en bon état
Anthraquinones	Laxatifs, stimulent le travail intestinal, facilitent le transit intestinal
Amers	Stimulent la sécrétion des glandes salivaires et des organes digestifs facilitant ainsi la digestion (stomachique).
Coumarines	Fluidifient le sang, protègent du soleil,relaxent les muscles
Flavonoïdes	Anti-inflammatoires, renforcent les vaisseaux capillaires
Glucosides cardiaques	Aident à maintenir le rythme cardiaque, diurétiques, abaissent la tension artérielle en transférant les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires.
Glucosides cyanogènes	Sédatifs, relaxants cardiaque et musculaire, suppriment ou calment la toux sèche
Glucosinolates	Augmentent le flux sanguin, favorisent l'évacuation des déchets, ralentissent la thyroïde
Huiles essentielles	La plupart ont des effets antiseptiques, d'autres, contiennent des agents anti-inflammatoires
Mucilages	Protègent les muqueuses telles que le tube digestif, gorge, poumons, reins et conduits urinaires des irritations ou des inflammations.
Phénols	Anti-inflammatoires, Antiseptiques
Saponines	Favorisent l'activité hormonale, expectorants, facilitent l'absorption des éléments nutritifs
Tanins	Rapprochent les tissus et augmentent la résistance aux infections, astringents

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels [34,60]. En effet, beaucoup de principes actifs isolés des plantes sont encore aujourd'hui irremplaçables par des produits de synthèse. C'est le cas de digitaline, morphine, scopolamine et la quinine qui est employée contre la malaria ou la diogoxine qui soigne le cœur, ou l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes. On peut aussi citer, comme principe actif, la rutine et ses dérivés (Cirkan®, Cyclo 3®, Ginkor®, Relvène®, Veinamitol®, Veinobiase®, Véliten®), la diosmine (Daflon®, Flébosmil®,

Diovénor®, Diosmil®, Dio 300®), l'hespéridine (Cirkan®, Cyclo 3®, Daflon®), les oligomères procyanidoliques (Endotélon®) ou la myrtille (Difrarel®)[34,60].

L'emploi accru de ses produits est dû à la découverte de nouvelles indications ou encore parce qu'ils constituent le point de départ de nombreuses hémisynthèses.

D'après les chercheurs qui élaborent des médicaments à partir de produits naturels il existerait un rapport étroit entre une préparation traditionnelle et le médicament obtenu à partir de la même plante [61]. En exploitant notre recherche bibliographique et notre étude ethnopharmacologique, on a essayé de faire une corrélation entre certaines plantes et leurs principes actifs isolés. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 1.5.

On a présenté au tableau 1.5, Pour 47 substances extraites des végétaux, une corrélation entre les utilisations traditionnelles de certaines plantes et l'action pharmacologique du médicament isolé.

Dans le cas où l'étude des usages ethnomédicaux d'une plante et les connaissances de l'action des substances chimiques qui en sont extraites apportent une preuve positive de corrélation, la mention "oui" est portée.

Sur le total des plantes figurant au tableau, la mention corrélation "oui" figure dans 36 cas. Ce qui représente 92, 30%

Pour 6 médicaments d'origine végétale, aucune corrélation n'a été observée entre leur utilisation en tant que médicaments et les emplois traditionnels des plantes dont ils proviennent. Il se pourrait toutefois qu'un examen plus approfondi des publications révèle quelques relations.

On assiste donc à la renaissance de la phytothérapie qui est loin de l'empirisme et des remèdes secrets d'autrefois. Actuellement, les plantes médicinales sont connues, standardisées, à teneur définie en principes actifs et sont utilisées de façon scientifique [34,60].

Tab.1.4. : plantes prises comme exemples pour la corrélation [61-63].

N°	FAMILLE	Nom scientifique	Nom français	Nom vernaculaire
1	hippocastanaceae	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Marronnier d'Inde	Kastal el aoud
2	rosaceae	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Aigremoine	Ward zawane
3	apiaceae =umbelliferae	<i>Ammi majus</i>	Cumin royal	Kamoun
4	apiaceae	<i>Ammi visnaga</i>	Khella	Noukha
5	chenopodiaceae	<i>Anabasis articulata</i>		Ajram
6	bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i>	Ananas	Ananas
7	compositae	<i>Artemisia compestris</i>	Armoise champetre	Tgouft,allel
8	solanaceae	<i>Atropa belladona</i>	Belladone	Bandiene,Bounajrouf
9	berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i>	Berberis	
10	brassicaceae	<i>Brassica nigra</i>	Moutarde noire	Khardal
11	theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	Théier	Athay, Chay
12	cannabaceae	<i>Cannabis sativa</i>	Chanvre	Til
13	caricaceae	<i>Carica papaya</i>	Papayer	Babaya
14	fabaceae=leguminosae	<i>Cassia acutifolia</i>	Caneficier	
15	fabaceae=leguminosae	<i>Cassia spp</i>	Cassia, Séné	Sana
16	apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i> = <i>Vinca rosea</i>	Pervenche de Madagascar	Kedab
17	rubiaceae	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Quinquina	
18	lauraceae	<i>Cinnamum camphora</i>	Camphrier	
19	liliaceae	<i>Colchicum autumnale L</i>	Colchique	
20	zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Curcuma	Korkom
21	asteraceae	<i>Cynara scolymus = C, cadunculus</i>	Artichaut	Khorchof
22	fabaceae=leguminosae	<i>Cytisus scoparius</i>	Genét à balais	
23	scofulariaceae	<i>Digitalis lanata</i>	Digitale laineuse	Kam'ia soufiya
24	scofulariaceae	<i>Digitalis purpurea</i>	Digitale pourprée	Kam'ia orjoiniya
25	ephedraceae	<i>Ephedra alata</i>	Ephedra	Alinda
26	erythroxylaceae	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocaier	Coca
27	oleaceae	<i>Fraxinus excelsior</i>	Frêne commun	Dardere
28	papilionaceae	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Reglisse	Erq-essous
29	malvaceae	<i>Gossypium spp</i>	Cotonnier	Kton
30	solanaceae	<i>Hyposcyamus niger</i>	Jusquiane noire	Banj
31	labiaceae=lamiaceae	<i>Mentha spp</i>	Menthe pouliot	Fliyou
32	solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabac	Tabagha
33	papaveraceae	<i>Papavr somniferum</i>	Pavot somnifère	Afioune
34	rosaceae	<i>Potentilla fragarioides</i>	Potentilles	
35	ericaceae	<i>Rhododendron molle</i>	Rhododendrons	
36	asteraceae	<i>Silybum marianum</i>	Chardon-marie	Chouk e-jmel
37	labiaceae=lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Thym vulgaire	Zaatar
38	liliaceae	<i>Urginea maritima</i>	Urginée maritime	
39	apocynaceae	<i>Vinca minor</i>	Petite pervenche	Kedab

Tab.1.5 : corrélation entre usage de la plante et son principe actif [61].

Plante N°	Médicament	Indication clinique	Indic. traditionnelle	Corrélation
1	Aesine	Anti inflammatoire	Inflammation	Oui
2	Agrimophol	Anthelminitique	Anthelminitique	Oui
3	Xanthoxine, Ammoidine	Leucodermie	Leucodermie	Oui
4	Khelline	Bronchodilatateur	Anthiasmatique	Oui
5	Anabasine	Myorelaxant	Dermatoses	Non
6	Bromelaine	Anti-inflammatoire	Inflammation	Oui
7	Santonine	Ascaricide	Anthelminitique	Oui
8	Atropine	Anticholinergique	Mydriatique	Oui
9	Berberine	Dysenterie bacillaire	Troubles gastriques	Oui
10	allyle	Révuksif	Révuksif	Oui
11	Theophylline, caféine	Diurétique, Stimulant	Diurétique, Stimulant	Oui
12	Tetrahydrocannabinol	Antiémétique	Euphorisant	Non
13	Papaine	Agent protéolytique	Digestif	Oui
14	Sennosides A et B	Laxatif	Laxatif	Oui
15	Dantrone	Laxatif	Laxatif	Oui
16	Vinblastine, Vincristine	Antinéoplasique	Diabète sucré	Non
17	Quinidine, Quinine	Antiarythm, Antipaludique	Antipaludique	Non ,Oui
18	Camphre	Révuksif, insecticide	Antiviral, insectifuge	Oui, Non
19	Colchicine, Démocolcine	Antigouteux, Antinéoplasique	Antigouteux	Oui, Non
20	Curcumine	Cholérétique	Cholérétique	Oui
21	Cynarine	Cholérétique	Cholérétique	Oui
22	Spartéine	Ocytocique	Diurétique, tannage	Non
23	Digoxine, Lanatoside	Cardiotonique	Cardiotonique	Oui
24	Digitoxine, Digitaline	Cardiotonique	Cardiotonique	Oui
25	Ephedrine	Sympathomimétique	Bronchite	Oui
26	Cocaine	Anesthésique local	Stimulant	Oui
27	Aesculétine	Antidysentérique	Dysentérie	Oui
28	Glycyrrhizine	Eduksorant	Eduksorant	Oui
29	Gossypol	Contraceptif	Baisse de la fertilité	Oui
30	Hyoscyamine	Anticholinergique	Sédatif	Oui
31	Menthol	Révuksif	Carminatif	Non
32	Nicotine	Insecticide	Narcotique	Oui
33	Morphine, Papaverine	Antitussif, Spasmolytique	Sédatif	Non , Oui
34	Codéine	Hémostatique	Hémostatique	Oui
35	Rhomitoxine	Antihypertenseur	Antihypertenseur	Oui
36	Silymarine	Antihépatotoxique	Troubles hépatiques	Oui
37	Thymol	Antifongique	Asthme et bronchite	Non
38	Scillarène	cardiotonique	cardiotonique	Oui
39	Vincamine	Stimulant cérébral	Tr. cardio-vasculaires	Oui

4. Valeur économique des plantes médicinales

La plupart des habitants des zones rurales comptent d'abord sur les plantes médicinales et aromatiques pour traiter leurs problèmes de santé et les utilisent en cosmétologie, en parfumerie et dans l'industrie alimentaire entre autres. Même dans les zones urbaines les habitants se tournent vers

des remèdes utilisant les plantes étant donné qu'ils sont considérés comme : moins chers , sans effets indésirables et ont tendance à être plus employés dans les maladies chroniques tels que le diabète, les rhumatismes, les cancers, ... [64].

En Afrique, plus de 80% de la population utilisent la médecine traditionnelle (MT) pour satisfaire ses besoins de soins de santé [64-66]. En Asie et en Amérique latine, les populations recourent encore à la MT du fait de circonstances historiques et de croyances culturelles. En Chine, la MT représente environ 40% des soins de santé dispensés. Il a été rapporté que 71% de la population de Chili et 40% de la population de Colombie utilisent la médecine traditionnelle[65-66].

Dans les pays développés, la MT devient de plus en plus populaire. C'est ainsi que le pourcentage de population qui l'utilise est : au moins de 75% en France, 70% au Canada, 48% en Australie , 42% aux Etats Unis, 38% en Belgique [64].

Par ailleurs, l'exploitation et le commerce des plantes aromatiques et médicinales (PAM) représentent, pour plusieurs familles dans la campagne et en ville, une source de revenu non négligeable. Pour s'en apercevoir, il suffit de constater l'épanouissement du marché des plantes médicinales et la multiplication des vendeurs de PM et/ou des produits cosmétiques à base de plantes [64].

Le commerce des plantes médicinales en Europe s'accroît à un rythme d'environ 10% par année. Au Royaume-Uni seulement, le commerce des plantes médicinales représente plus de 293 millions Euros chaque année. L'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 % où on a estimé aussi que ces produits ont une valeur monétaire allant de deux à dix milliards de dollars[67]. En Malaisie, 500M\$US sont dépensés annuellement pour les soins de santé relevant de la MT, alors que la médecine allopathique ne recueille qu'environ 300M\$US[64].

Aux Etats Unis, les dépenses totales pour la MT sont estimées à 2.700M\$US en 1997 et à près de 34 milliards de dollars en 2007. Ces dépenses représentent environ 1,5% du total des dépenses de santé des Américains qui tournent autour de 2 200 milliards de dollars, selon une étude des Instituts nationaux de la santé (NIH) [64].

En Australie, ces dépenses sont de 80M\$US/an, au Canada 2.400M\$US/an, au Royaume Uni 2.300M\$US/an [64].

Cette utilisation largement répandue s'explique par la demande mondiale en PAM et leurs dérivés pour l'agro-alimentaire, la phytothérapie, les parfums et les produits cosmétiques naturels n'a fait qu'augmenter. L'Europe détient le plus grand marché, suivie par l'Asie, l'Amérique du Nord et le Japon. Les USA constituent le marché qui évolue le plus rapidement. L'industrie médicale mondiale

utilisant les PAM a augmenté de façon exponentielle au cours de ces dernières décades suite à la révolution « bio »; «environnement sain» et «développement durable». La Chine et l'Inde sont les plus grands exportateurs des PAM. Hongkong, le Japon, les USA et l'Allemagne sont les premiers importateurs [68]. Ainsi, le marché global des PAM est estimé à 30 Milliards de dollars en l'an 2000 et à 64 Milliards de dollars en l'an 2012 [69].

Conclusion

Comme la plupart des plantes médicinales poussent naturellement dans un grand nombre de pays, une plante qui présente un intérêt potentiel dans un pays peut fort bien avoir fait ailleurs l'objet d'une étude scientifique. Si les observations ainsi faites étaient communiquées à toutes les personnes intéressées, beaucoup de temps et d'efforts pourraient être épargnés. Lorsqu'il s'agit de drogues, la mise en commun des informations est particulièrement capitale vu qu'un jugement de valeur sur l'innocuité ou l'efficacité d'une drogue donnée peut rarement s'appuyer sur les résultats d'une seule étude.

L'ethnobotanique est une discipline scientifique dont le but est de mieux connaître les pharmacopées traditionnelles utilisées dans certaines régions. Parmi les 300 000 espèces de plantes recensées dans notre planète, moins de 15% ont fait l'objet d'analyses chimiques fines pour détecter d'éventuels principes actifs [64].

Les substances contenues dans les plantes sont de nature chimique variée. A partir des plantes médicinales, on peut obtenir différentes préparations : infusions, décoction, macération dans l'alcool (teinture) ou dans l'huile (extraction huileuse, plus rare), etc.

Les plantes médicinales et leurs utilisations diverses peuvent jouer un rôle important dans l'économie surtout dans les pays en voie de développement qui peuvent à un certain degré remplacer quelques importations des pays développés, d'où la nécessité d'une meilleure prise en charge de ce patrimoine national (étude, culture, protection...) et de ce fait les travaux sur la chimie de ces plantes développés aux niveaux des universités et des institutions doivent être encouragés pour mettre en évidence la spécificité de ces plantes.

Eléments des références bibliographiques

- [1] Girre L. **1997**. "Traditions et propriétés des plantes médicinales : Histoire de la pharmacopée". Privat, Ed. Santé. Toulouse, p 39.
- [2] Cheriti A. **2006**. "Apport de la civilisation musulmane à la chimie pharmaceutique". Annale Univ. Bechar; N°2: p4.
- [3] Cheriti A. **2005**. "Stratégies de recherche chez les savants musulmans : Cas de la pharmacognosie". Conférence cercle EL RAZI, centre univ. Bechar.
- [4] Benarous K. **2006**. "Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, *trypsin* et *lipase*", université Amar Telidji Laghouat, Algérie.
- [5] Beloued A. **1998**. "Plantes médicinales d'Algérie". Office de Publications Universitaires, 277.
- [6] www.philalgerie.com (consulté le 22/04/2010)
- [7] Cheriti A. **2009**. "L'ethnopharmacologie en Algérie: entre héritage et valorisation". *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar 04-05 decembre.
- [8] www.mediterranean.htm (consulté le 22/04/2010)
- [9] Konemann. **1999**. "Guide illustré du Bien-être, phytothérapie". Édition française. P 6, 10.
- [10] Pelt J.M. **2004**. "Les vertus des plantes". Ed du Chêne, France, 183 p. cité par Julie Nguyen Pouplin "plantes antipaludiques du Vietnam Etude ethnopharmacologique et chimique" Thèse de doctorat, **2007**.
- [11] Legseir B. **2009**. "Stratégie de découverte d'effet thérapeutique d'une plante". *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar 04-05 Decembre.
- [12] Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. **2007**. "La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires". Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- [13] Feurier P. **1999**. "Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de la France". ed : connaissance et mémoires européens.
- [14] Agence du médicament. **1998**. "Médicaments à base de plantes" - Les cahiers de l'Agence n°3, 81 p. Saint-Denis
- [15] Bezanger L., Pinkas M., Torck M. **1975**. "Les Plantes dans la thérapeutique moderne". Maloine.
- [16] Bruneton J. **1988**. "Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie". Lavoisier.
- [17] Strang C. **2006**. Larousse medical. Ed Larousse.
- [18] Delaveau P. **1982**. "Histoire et Renouveau des Plantes Médicinales". Albin Michel,
- [19] Duraffourd C., Lapraz JC. et Chemli R. **1997**. "La Plante Médicinale, de la Tradition à la Science". Grancher.

- [20] Lampe JW. **1999**. "Health effects of vegetables and fruit". *Am J Clin Nutr*; 70:475S-90S.
- [21] Thomas M. **2011**. "Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)". Thèse de doctorat, univ. d'Orléans
- [22] Sijelmassi A. **2003**. "Les plantes médicinales du Maroc", Ed. Le Fenec, Casablanca, Maroc
- [23] Armouche H. **2007**. "El Aachab fi kiteb". 4ème ed Dar El Nafais, Damas, Syrie
- [24] sites.univ-provence.fr/wabim/d_agora/.../lipides.pdf. (Consulté le 25/04/2010)
- 25] Cheriti A., Rouissat A., Sekkoum K. & Balansard G. **1995**. "Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El Bayadh (Algérie)". *Fitoterapia*. Vol. 66(6) : 525-538.
- [26] Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J. **2005**. "Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique". *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- [27] Walton N.J. et Brown D.E. **1999**. "Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products"; Ed: World Scientific; p: 1-14.
- [28] Mann J., Daridson R.S., Hobbs J.B., Banthorope D.V. et Harborne J.B. **1994**. "Natural Product : Their chemistry and biological significance", 1^{ère} Edition.
- [29] Bronner W.E., Beecher G.R. **1995**. "Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates". *Journal of Chromatography A.*, 705: 247-256.
- [30] Crozier A. **1997**. "Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J.Chromatography A.* 761: 315-321.
- [31] Justen U., Knuthsen P. et Leth T. **1998**. "Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection". *Journal of Biochem. Biophys.* 162: 432-438
- [32] Hollman P.C.H. et Katan B. **1999**. "Dietary flavonoids: Intake health effects and bioavailability". *Food Chem. Toxicol.*; 37: 937-942.
- [33] Bruneton J. **1999**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec. & Doc. Lavoisier.; p 1120.
- [34] Iserin P. **2001**. "Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins". Ed Larousse. p10-12
- [35] Booth N.L., Nikolic D, Van Breemen R.B., Geller S.E., Banuvar S., Shulman L.P., Farnsworth N.R. **2004**. "Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements". *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 76(6):511-516.
- [36] Deiana M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F. et Bonsignore L. **2003** "Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L.". *Journal-of-the-American-oil- Chemists- Society*, 80, 65-70,

- [37] Maged A.S. **2002**. *J. Braz. Chem. Soc.*, 13, 67-69. Cité par Touafek O. **2010**. "Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algériens" Thèse de doctorat en sciences, Univ. Mentouri-Constantine
- [38] Chun C., Ming-Hong Y., Yen-Yin C., Cheng-hsung C. et Tsumo N. **1991**. *American Journal of Chinese Medicine*, 17, 265-274.
- [39] Hofmann L. **2003**. "Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes", Thèse de doctorat, univ. strasbourg, France.
- [40] Raffaelli B. **2002**. "Enterolignans" *Journal Chromatography B*, 777(1-2) :29-43.
- [41] Braham H., Mighri Z., Ben Jannet H., Matthew S. and Abreu P. **2005**. "Antioxydant phenolic glycosides from *Moricandia arvensis*", *Journal of natural products*, vol. 68, no4, pp. 517-522.
- [42] Kosmas H., Trojanovska M. et Osbourn A. **2002**. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol. 75, 32-44.
- [43] Berger J. M. **2001**. Thèse de Doctorat, Virginia.
- [44] Agrawal P.K., Jain D.C., Gupta P.K. et Takur R.S. **1985**. "¹³C-NMR spectroscopy of steroidal saponinins and steroidal saponins". *Phytochemistry* 24, 2479.
- [45] Rizk A.M. **1986**. "The phytochemistry of the flora of Qatar" *scientific and applied research center university of Qatar*
- [46] Rafael F., Elena C. **2005**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". *Phytochemistry*, Vol.66 (12), 175-185
- [47] Troyer John K., Katherine K. Stephenson, Jed W. Fahey. **2001**. "Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, (919) 299–304
- [48] Huang M.T., Ferraro T., Ho C.T. **1994**. "Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables". In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*; ACS Symposium Series 546; *American Chemical Society*: Washington, DC, 181-196.
- [49] Iori R., Rollin P., Streicher H., Thiem J. and Palmieri S. **1996**. "The myrosinase-glucosinolate interaction mechanism studied using some synthetic competitive inhibitors". *FEBS Lett.* 385: 87-90.
- [50] Yogeshwer S., Neetu k., Sarika k. and Siddiqui A. **2004**. "Chemopreventive Effect of Indole-3-Carbinol on Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci". *Nutrition and cancer.* 50 (2), 214-220.
- [51] Hayes J.D., Kelleher M.O and Eggleston I.M. **2008**. "The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates". *Eur J Nutr.* 47: 2:73-88.
- [52] Reginald H. and Charles M. **2000**. "Biochimie", 2^{ème} édition, De Boek université, 106-109,
- [53] Nesmy A. **1980**. "Fundamentals of Organic Chemistry", Vol.4, *Mir publishers*, Moscow,
- [54] Richter G. **1993**. "Métabolisme des végétaux", Presses Polytechniques et universitaires Romandes, 300-308.
- [55] Moreau R.A., Whitaker B.D. and Hicks K.B. **2002**. "Phytosterols, phytostanols, and their conjugates

in foods". *Progress in lipid research*, 41, 457-500.

[56] Howell T.J. **1999**. "Effects of natural and synthetic phytosterol Administration on cholesterol Metabolism in Normolipidemic Humans", *National Library of Canada*.

[57] Kark H. **1997**. "The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition". *South African Journal of Science*, 93, 263-268.

[58] Kritchevsky D. and Shirley C. **2005**. "Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review" *Nutrition Research*, Vol.25, 413-428.

[59] Radimer K. **2004**. "Dietary supplement us by US adults : data from the national Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000", *Am. J. Epidemiol*, 160:339-349

[60] Verdrager J. **1978**. "Ces médicaments qui nous viennent des plantes", Ed. Compiègne, 9.

[61] Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. **1986**. "Places des plantes médicinales dans la thérapeutique". *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, 64 (2) : 159-164.

[62] Belboukhari N. **2007**. "Etude chimique et evaluation biologique de deux plantes medicinales de la region de Bechar, *Launea arborescens* et *Limoniastrum feei*", Thèse de doctorat. Univ. de Sidi Bellabes Algérie.

[63] Demilly D., Mannino M. R., Dragos L. et Rossignol G. **2001**. "Liste alphabétique des principales espèces de plantes cultivées et de mauvaises herbes" 7eme Ed. Geves- la miniere, Guyancourt cedex.

[64] OMS, **2002**. "Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques : Donner un soutien aux pays pour réduire le manque d'accès aux médicaments". Rapport annuel, (*publication régionale, SEARO N°.39*)

[65] Anne-Laure. **2002**. "Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *J. Elegantissima* (Scrophulariaceae)". Thèse de Doctorat, Université de Lausanne.

[66] Lazaro L. **2005**. "Usage durable des plantes médicinales en Afrique du Nord" Communication concernant le programme de la biodiversité en Afrique du nord UICN- Centre de Coopération pour la Méditerranée, Malaga.

[67] Small E. et Catling P. M. **2000**. "Les cultures médicinales canadiennes", Version française de Canadian medicinal crops, *Les Presses scientifiques du CNRC*, Ottawa, p.281.

[68] Rabodo A. **2002**. "Les grandes orientations et stratégies dans le domaine de la production de médicaments à base de plantes médicinales". *Comité Régional d'experts sur la médecine traditionnelle (OMS/AFRO)* faculté de pharmacie, Paris.

[69] Belkhiri A., Alouana A., Derouiche TT., Dalia F. **2013**. "Theriaq, un projet de banques de données sur les plantes médicinales et toxiques d'Algérie". *4^{eme} Phytochem & Biosub conference* 1 ,2 décembre. Bechar Algérie.

CHAPITRE II

LES FLAVONOÏDES: APERÇU GENERAL

1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange [1]. Cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *favus* ; (*favus*=jaune) [2,3].

Les flavonoïdes ont été isolés par E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [4].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [5].

2. Distribution et localisation

2.1. Distribution : Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens [6].

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts et les pois. Autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis. Les flavones, apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri [7].

On trouve la chrysin, la quercétine et la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les trouvent dans les sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires [8].

Tab.2.1 : Distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes [9-12]

Fruits et Légumes	Mg / Kg	Aglycones
Persil	500	Apigénine
Ciboulette	10 1	Quercétine + Kaempférol
Laitue	320	Quercétine
Oignon	300	Quercétine + Kaempférol
Endives	290	Kaempférol
Poireau	100	Quercétine + Kaempférol
Céleri	100	Apigénine + Lutéoline
Haricots	70	Quercétine + Kaempférol
Brocolis	35	Quercétine + Kaempférol
Tomate	10	Quercétine + Kaempférol
Chou-fleur	3	Quercétine + Kaempférol
Pomme de terre	3	Quercétine + Kaempférol
Orange	170/280	Hespérétine
Pamplemousse	270/600	Naringenine
Myrtilles cultivées	165	Quercétine
Cerises	100	Quercétine + Kaempférol
Raisins	50/100	Quercétine + Myricétine
Cassis	80	Quercétine + Kaempférol
Abricots	55	Quercétine
Mûres	50	Quercétine + Kaempférol
Pommes	30	Quercétine
Framboises	30	Quercétine + Kaempférol
Prunes	30	Quercétine + Kaempférol

2.2. Localisation : Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants [13].

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles [1], la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique [14].

3. Structure chimique et classification

3.1. Structure : Plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés [15,16]. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, ils ont tous la même structure chimique de base (Figure 2.1) [17]. Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [18].

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 [19], en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [20].

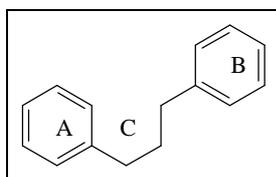


Fig.2.1: Squelette de base des flavonoïdes.

3.2. Classification : Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 comme intermédiaire [20].

Les flavonoïdes contenant un groupe d'hydroxyle en position C-3 du cycle C sont classifiés comme 3-hydroxyflavonoïdes (flavonols, anthocyanidines, catéchine), et ceux manquant de (OH), comme 3-desoxyflavonoïdes (flavanones et flavones) [20].

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone. Les glycosides sont habituellement O-glycosides, avec la partie de sucre liée au groupe d'hydroxyle à la position C-3 ou C-7. Les parties de sucre les plus communes sont, D - glucose et L- rhamnose [20].

Les anthocyanidines et la catéchine, d'autre part, manquent du groupe carbonyle sur C-4 [21].

3.2.1. Flavones et Flavonols: Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre. D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent

être des groupes hydroxyles (OH) comme peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3[21].

3.2.2. Flavanones et Dihydroflavanonols : Les flavanones et les dihydroflavanonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavanonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols[21].

3.2.3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols : A la différence des flavonoïdes décrits au-dessus, ces deux groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols).

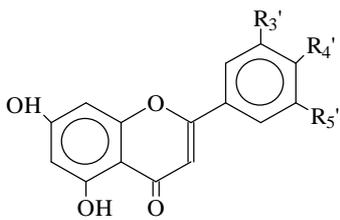
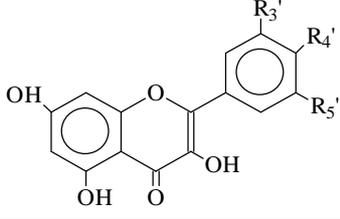
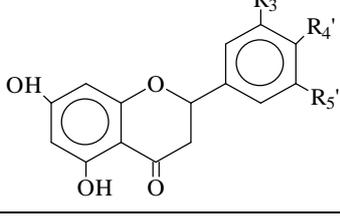
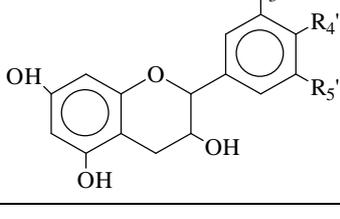
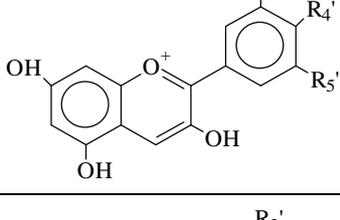
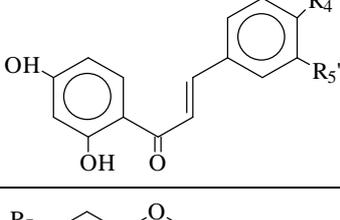
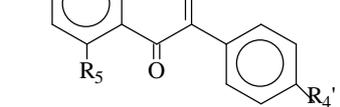
Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés.

3.2.4. Chalcones : Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes cités au-dessus, par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α,β -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes [21].

3.2.5. Anthocyanes : Les anthocyanes, molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible. A côté de la chlorophylle, les anthocyanes sont le groupe le plus important des pigments de plantes visible à l'œil humain. Les anthocyanes ont une structure de base commune, le cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrilium. Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélargonidol et le cyanidol. Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique[21].

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres groupes ; le cycle B est lié à C-3 du cycle C au lieu de C-2.

Tab.2.2: Principales classes des flavonoïdes [18,20]

Classe	Structure chimique	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Exemple
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Flavanes (Flavanol)		OH	OH	H	Catéchine
		OH	OH	OH	Galocatéchine
Anthocyanes		H	OH	OH	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Chalcones		R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Exemple
		OH	H	OH	3',5',5,7-tetrahydroxy chalcone
Isoflavones (isoflavonoïde)		R ₅	R ₇	R ₄ '	Exemple
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	OH	OH	Daidezine

4. Nomenclature [22]

Le système de nomenclature le plus souvent utilisé par les auteurs pour les flavonoïdes fut initialement suggéré par Hemingway, puis étendu par Porter en 1980 [23]. Les flavonoïdes et les proanthocyanidines ont un squelette possédant deux cycles aromatiques et un hétérocycle oxygéné, la numérotation des atomes s'effectue comme indiqué sur la **figure 2.2**.

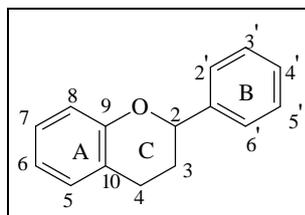


Fig.2.2: Squelette des flavonoïdes avec la numérotation des carbones.

En général, il y a deux systèmes parallèles pour la nomenclature des flavonoïdes, le premier est basé sur des noms insignifiants, tels que la flavane et la chalcone, comme structure parente; l'autre est basé sur la nomenclature chimique systématique, tel que 3,4-dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyrane (nomenclature IUPAC) pour des flavanes et 2-phenyl-4-oxo-4H-1-benzopyrane pour la flavone.

Il y a également deux systèmes pour indiquer les substituants autour des noyaux flavane ou flavone.

-Un dans lequel des substituants précis sont placés en des positions précises des trois cycles comme par exemple 3, 5, 7,3',4'-pentahydroxyflavone à qui est attribué le nom de quercétine, l'autre utilise la nature et la position des substituants suivies du nom du noyau en question[24].

Des noms insignifiants sont utilisés intensivement dans la littérature pour la nomenclature des flavonoïdes. Certains indiquent la classe du composé comme par exemple la fin « inidine » qui dénote une anthocyanidine comme la pélagonidine alors que la fin « étine » dénote un flavonol comme la quercétine. L'évolution des noms a fait que certains glycosides ont des noms particuliers notamment certains dérivés de la quercétine comme la quercitrine qui désigne la 3-rhamnosylquercétine, l'isoquercitrine qui désigne la 3-glucosylquercétine ou la quercimetrine qui désigne la 7-glucosylquercétine. Cependant, il y a peu d'uniformité dans l'appellation des flavonoïdes et beaucoup de noms sont dérivés du nom générique ou spécifique de la source comme tricine de *triticum* ou hypolaétine de *hypoleana*) [24].

Les classes ayant une configuration 2*R*, 3*R* adoptent le préfixe "epi". Celles ayant une configuration 2*S* adoptent le préfixe "ent". Les flavones possèdent une fonction carbonyle en position 4. Les liaisons interflavonoïdes sont indiquées de la même façon que pour les

polysaccharides et la configuration des liaisons en C4 est indiquée par la nomenclature α , β [25], à l'intérieur des parenthèses symbolisant la liaison.

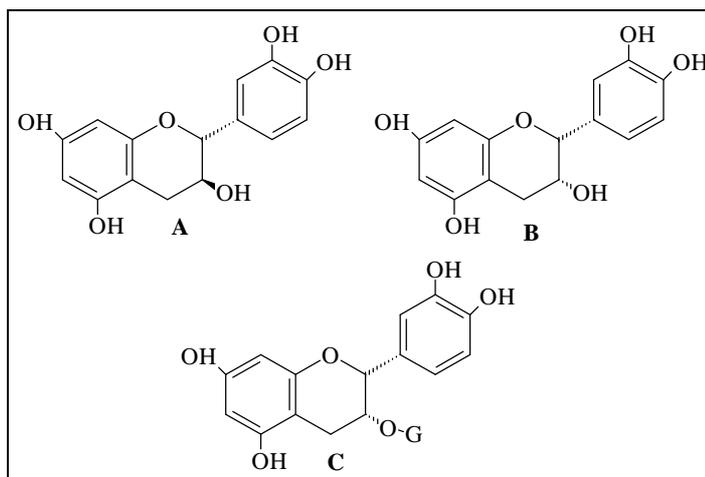


Fig.2.3 : Exemples de nomenclature : catéchine(A), épicatechine(B) et épicatechine (α -O- β)-D- glucopyranoside(C) [25]

5. Biosynthèse

La biosynthèse de flavonoïdes (**Figure 2.4**) [17,26] se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2): apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2R,3R)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside. Autre étude [27] a proposé une autre voie de biosynthèse presque similaire à la précédente (**Figure 2.5**).

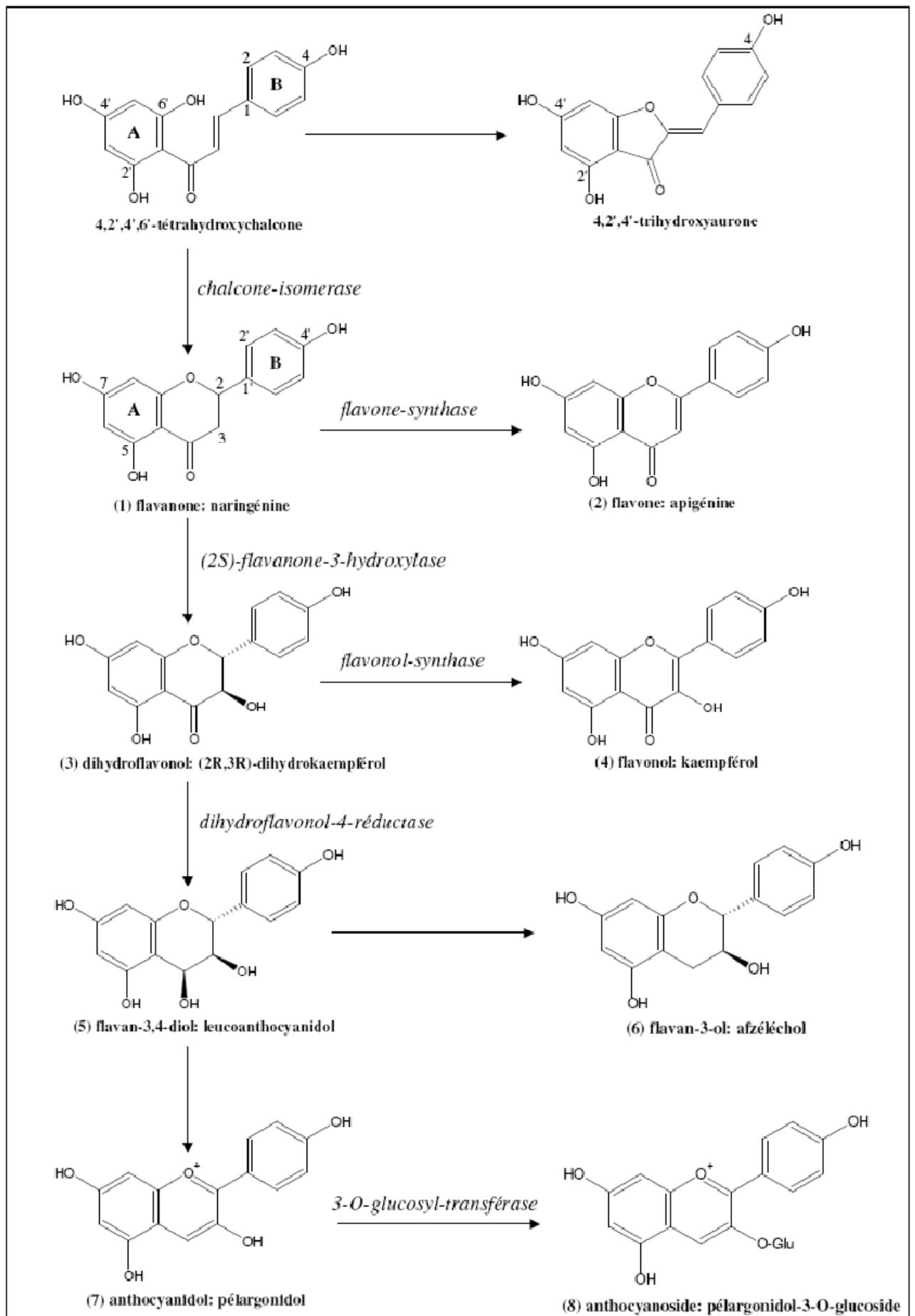


Fig. 2.4: La biosynthèse des flavonoïdes [17,26].

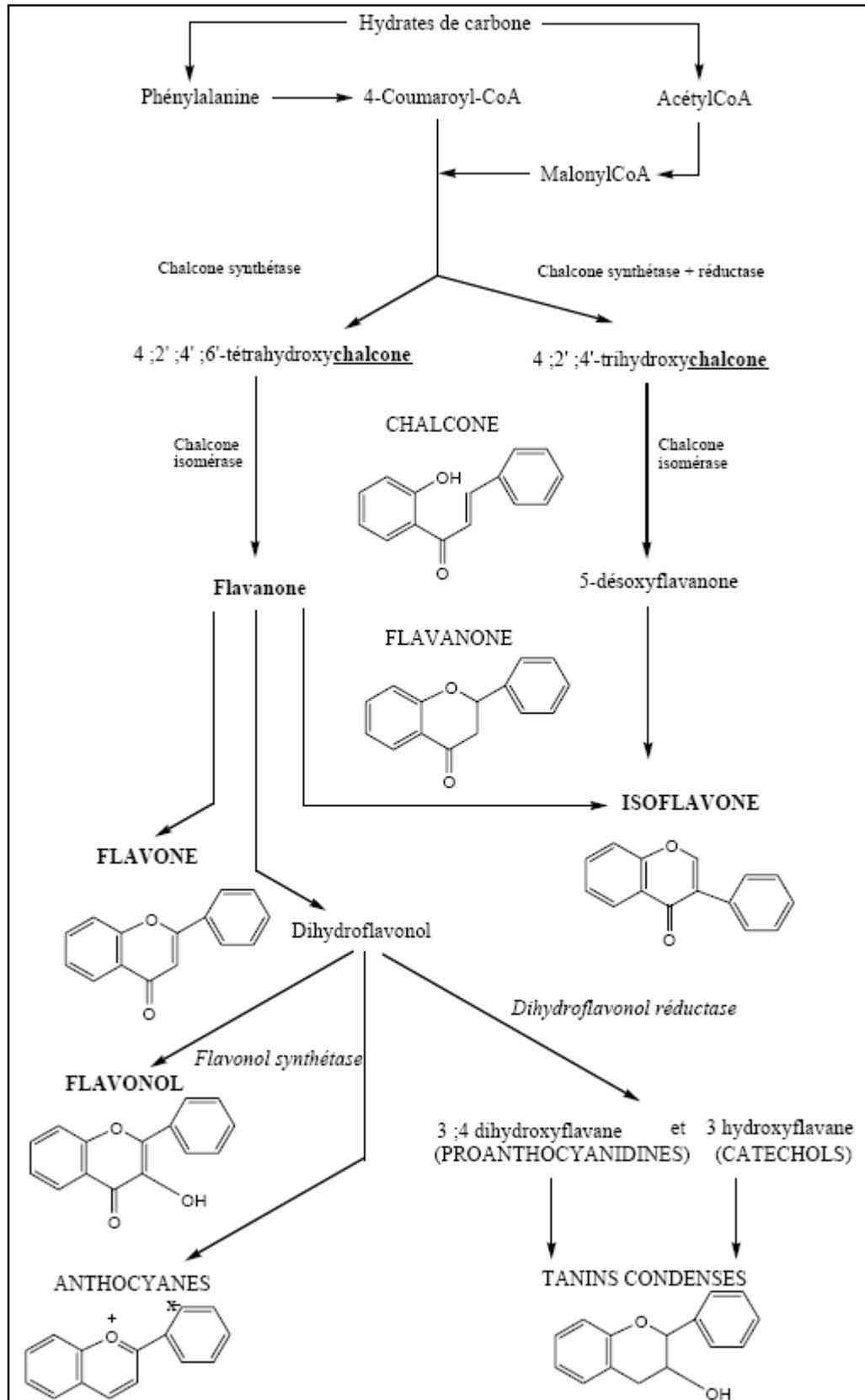


Fig. 2.5: Autre voie de biosynthèse des flavonoïdes [27].

6. Substitutions du squelette flavonoïque [28].

Les substitutions du squelette flavonoïque sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthylation et des glycosylations.

a- L'hydroxylation : Dans toutes les classes des flavonoïdes, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques : en position C-5, C-7 et C-4'. Ces hydroxyles sont appelés des hydroxyles originels (OH-7 et OH-5), ils sont introduits avant la formation du noyau chalcone [29]. L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fait après la fermeture de l'hétérocycle C c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3',4',5') se fait par le biais des enzymes (hydroxylases) [30]. Enfin, les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [31].

b- La méthylation : La méthylation des groupes hydroxyles portés par le squelette flavonoïque se fait sous l'action de l'enzyme O-méthyl transférase en présence de S-Adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur du groupement méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [30]. Dans le cas de flavones et flavonols, cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7,8), noyau B (carbones 2',3',4',5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone [30].

c- O-glycosylation : La liaison aglycone-sucre s'effectue par le biais d'un hydroxyle phénolique et l'hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) après perte d'une molécule d'eau créant ainsi un pont oxygéné entre les deux parties.

La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme O-glycosyl transférase et un donneur de sucre comme UDP-GLU (Uridine diphosphate glucose) [32].

La partie osidique peut être mono, di ou tri-saccharidique. La liaison entre la génine et l'ose peut se faire avec n'importe quel des hydroxyles phénoliques de la génine, mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui ont une plus grande labilité [17].

7. Propriétés des flavonoïdes

7.1. Propriétés antiradicalaires : L'organisme possède ses propres mécanismes de défense permettant de lutter contre les radicaux libres ou les espèces oxygénées réactives, il s'agit principalement d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase).

L'action protectrice de ces enzymes est complétée par celle de différents réducteurs présents dans les structures lipoprotéiques.

Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité des systèmes de défense, les radicaux libres n'auront pas d'effets néfastes majeurs. Toutefois, si les possibilités de protection enzymatique sont dépassées par des quantités importantes de radicaux ces derniers vont engendrer :

- des peroxydations lipidiques favorisant l'athérosclérose et le vieillissement,
- des modifications oxydatives des protéines les rendant inactives,
- des dommages oxydatifs de l'ADN et de l'ARN aboutissant à des mutations et à la cancérisation.

Les flavonoïdes hydroxylés (FLOH) sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles (FLO[•]) moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle, ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R[•]; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

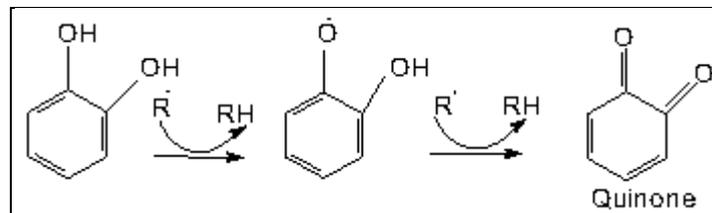
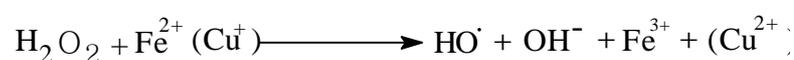


Fig. 2.6 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R[•]) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable [34]

7.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques : Les ions métalliques sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu²⁺ est un stimulateur de la peroxydation des LDL [34]. Ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont capables de former des complexes par chélation d'ions métalliques à charge élevée tels que Ca^{2+} , Al^{3+} ou Mg^{2+} . (**Figure 2.7**) :

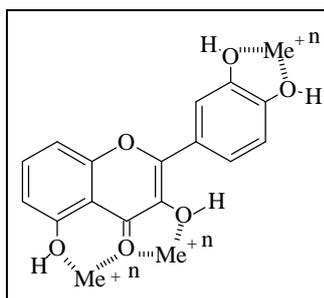


Fig.2.7 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [3, 18,34]

7.3. Effets antimicrobiens des flavonoïdes : Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes pour déterminer en général, les propriétés médicinales et en particulier les propriétés antimicrobiennes. Beaucoup de groupes de recherche ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce [35-37].

Tab.2.3 : Quelques flavonoïdes antimicrobiens [38]

Flavonoïdes	Mécanisme
4'-méthoxyflavone	Se complexer aux protéines extracellulaires
Abyssinone	Inactiver les enzymes et empêcher la transcriptase inversée du HIV
Catéchine	Se complexer aux protéines extracellulaires
Chrysin	Grippage aux adhésions complexes avec le mur de cellules
Épicatéchine	Rupture de membrane

7.3.1. Activité antibactérienne: Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries. Des études ont montré le pouvoir antibactérien des flavonoïdes contre des souches de bactéries gram (+) et gram (-) [39-41].

Des études [42,43] ont apporté l'évidence de l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie *staphylococcus aureus*.

7.3.2. Activité antifongique: Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études a démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Cirtus parasidi* de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*[44]. En effet, la naringinine, l'hésperidine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *P. digitatum*[44].

D'autres flavonoïdes extraits de la poudre des inflorescences mâles de *Borassus dethiopum* ont une activité contre des dermatophytes comme *Trichophyton rubrum* grâce à des fractions flavonoïques [45]. Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica* L. ont une action fongicide et

fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes*[46].

7.4. Propriétés anticancéreuses: Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses [47,48]. Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate, ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques i.e. FAS (Fatty Acid Synthase) [49].

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes [48,50-52] :

- Piégeage des radicaux libres,
- Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique,
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène,
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes,
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses,
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses,
- Induction de l'apoptose,
- Inhibition des processus d'angiogénèse.

7.5. Propriétés anti-inflammatoires: De nombreuses études indiquent que les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations[53, 54].

La quercétine a un effet anti- inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse : la cyclooxygénase (pour les prostaglandines) et la li-oxygénase (pour les leucotriènes) des principaux médiateurs de l'inflammation [55].

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS)[53], bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs [4], car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxy-nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer [53].

7.6. Propriétés antivirales : Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales permettant ainsi une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours [56]. D'autres chercheurs [57] ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Les travaux de Spedding et al. [58] ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1 qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte [59].

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 intégrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2[60].

7.7. Propriétés antiallergiques : Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules [61].

7.8. Propriétés nutraceutiques : Le terme nutraceutique a été intervenu en 1979 par Steph De Felice [62], il s'agit d'une appellation commerciale élaborée par les industriels qui résulte de la contraction de "Nutrition" et de "Pharmaceutique"[63,64].

Les nutraceutiques sont des composés qui n'ont pas une valeur calorique mais qui ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies [65]. Les produits nutraceutiques fondamentaux des plantes sont les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes en raison de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine [65].

7.9. Activité anti-ulcérogène: Les flavonoïdes protégeraient la muqueuse gastrique contre les agents ulcérogènes. La quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes via la production de mucus et de ses propriétés antioxydantes [5]. D'autres études ont permis

d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel [66,67].

7.10. Prévention de la cataracte diabétique : Les flavonoïdes préviendraient la cataracte diabétique en inhibant l'aldose réductase. La myricétine possède des propriétés hypoglycémiantes et hypotriglycéridémiantes chez les animaux diabétiques [68].

7.11. Activité anti-ostéoporose : L'ostéoporose est une pathologie caractérisée par une densité minérale osseuse relativement faible, surtout chez les femmes âgées. De nombreux nutriments comme la vitamine D, les minéraux et certaines protéines permettent le maintien osseux. Certains flavonoïdes inhiberaient la résorption osseuse ostéoclastique selon des mécanismes encore inconnus [69].

7.12. Autres propriétés des flavonoïdes : Par leur propriété "vitaminique P", les flavonoïdes diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires, renforçant leur résistance (artères, veines, capillaires, lymphatiques).

Une des fonctions des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes, et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant une étape fondamentale de sa reproduction [70,71].

Les flavonoïdes présentent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant de manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance.

-Protection des plantes contre les radiations ultra violettes (UV).

-Agissent comme des pigments ou des co-pigments

-Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire [72].

En fin, le tableau 2.4 donne des exemples de médicaments commercialisés à base de flavonoïdes.

Tab.2.4 : Quelques médicaments à base de flavonoïdes [73].

Nom du médicament	Substance active	Activités
<i>DIAMORIL</i> ®	La benzoquercine	Ces médicaments sont des protecteurs vasculaires, ils stimulent la circulation du sang dans les veines et luttent contre l'altération des vaisseaux capillaires.
<i>DAFLON</i> ®	Flavonoïdes extraits de rutacées (aurantiées)	Ils sont utilisés dans le traitement symptomatique -Des jambes lourdes, impatiences et autres troubles en rapport avec une mauvaise circulation veineuse ou lymphatique. -Des crises d'hémorroïdes.
<i>URISPAS</i> ®	Flavoxate chlorhydrate.	Ce médicament est utilisé dans le traitement des envies impérieuses d'uriner dues à une instabilité de la vessie et entraînant des fuites d'urine.
<i>FLAVOQUINE</i> ®	Amodiaquine	Ce médicament est un antipaludique de synthèse.

8. Etude chimique des flavonoïdes

Pour faire une investigation phytochimique qui consiste principalement en l'isolement et l'identification structurale de produits naturels à partir de végétaux, il est nécessaire, voir même indispensable de bien choisir la partie du matériel végétal et en fonction de la nature des produits recherchés, adapter et optimiser les techniques ou les méthodes physicochimiques nécessaires [74].

8.1. Extraction : Pour avoir une extraction complète, il est recommandé d'utiliser des échantillons secs, gelés, ou lyophilisés. En effet, les composés phénoliques dont les flavonoïdes font partie, sont instables et peuvent être dégradés par l'action d'enzymes s'ils ne subissent pas un séchage préalable [75].

Les fours à séchage diminuent l'extraction de quelques types de flavonoïdes tels que les catéchines lesquelles resteraient liés aux fibres et protéines, en plus, une dégradation thermique peut avoir lieu. Par contre, l'élimination d'eau par lyophilisation n'affecte pas excessivement les composés, et permet leur entretien pour de longues périodes. La congélation préalable des échantillons est aussi recommandée puisque les cristaux gelés produisent des lésions dans la structure cellulaire du matériel végétal et par conséquent facilite le sort des composés et donc facilite le processus d'extraction [75].

L'isolement d'une substance naturelle ou synthétique nécessite souvent une extraction avec un solvant organique ou minéral. Il y a en général deux types d'extraction : L'extraction solide-liquide et l'extraction liquide-liquide (continues et discontinues).

L'objectif de l'extraction des flavonoïdes de leurs sources végétales est de les libérer des vacuoles où ils se trouvent, que ce soit par rupture des tissus de plantes ou à travers un processus de diffusion [75].

Des méthodes dites conventionnelles, comme la macération, le Soxhlet et l'extraction par percolation ou par reflux, étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels.

8.1.1. La macération : est un procédé discontinu qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant, pour en extraire les constituants solubles. Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité [76]. De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé (24 h) et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée [76].

Après filtration, le résidu peut être remis dans le récipient d'extraction avec une nouvelle portion de solvant.

Au besoin, le processus est répété plusieurs fois. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, surtout avec les solvants à ébullition, mais le processus d'extraction n'est pas toujours très efficace [76].

8.1.2. L'extraction par l'appareil de Soxhlet : Cette technique permet le traitement de solides (matériel végétal) en plus grande quantité, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté [77].

Dans un autre travail [78], l'extraction a été réalisée au Soxtec pour préparer de petites quantités d'extraits pour les tris biologiques préliminaires. Le Soxtec entre dans la nouvelle génération des systèmes d'extraction (Figure 2.9). Le principe d'extraction est basé sur celui de l'extracteur de

Soxhlet. Cependant, il possède de nombreux avantages du point de vue de la durée d'extraction, de la quantité de solvant utilisé et du nombre d'échantillons à traiter au cours d'une seule manipulation. En effet, le Soxtec permet à l'utilisateur de réaliser des extractions en lots allant jusqu'à six échantillons au cours d'une seule manipulation dont la durée est d'environ une heure.

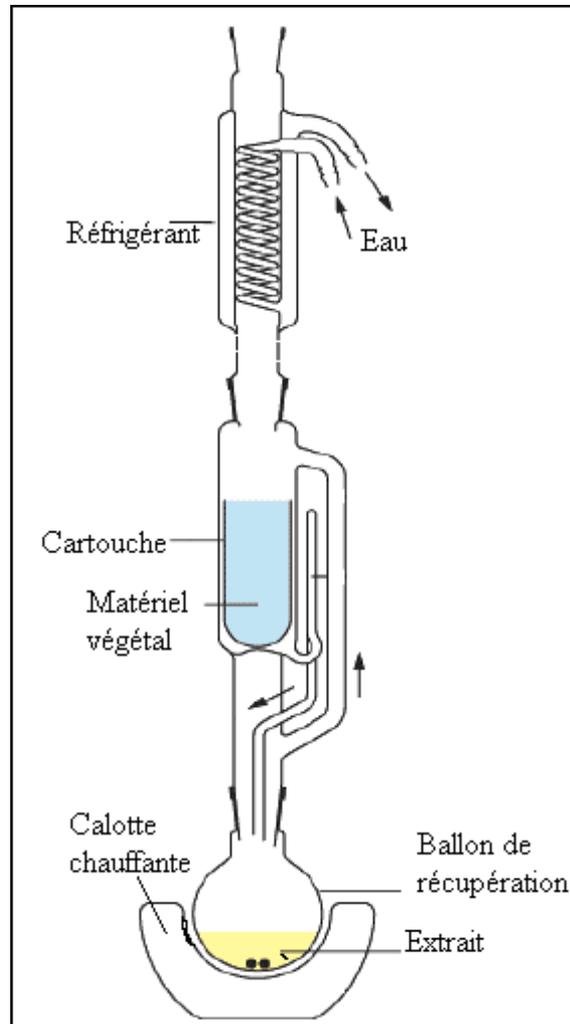


Fig. 2.8. Systeme soxhlet [77 ,78]

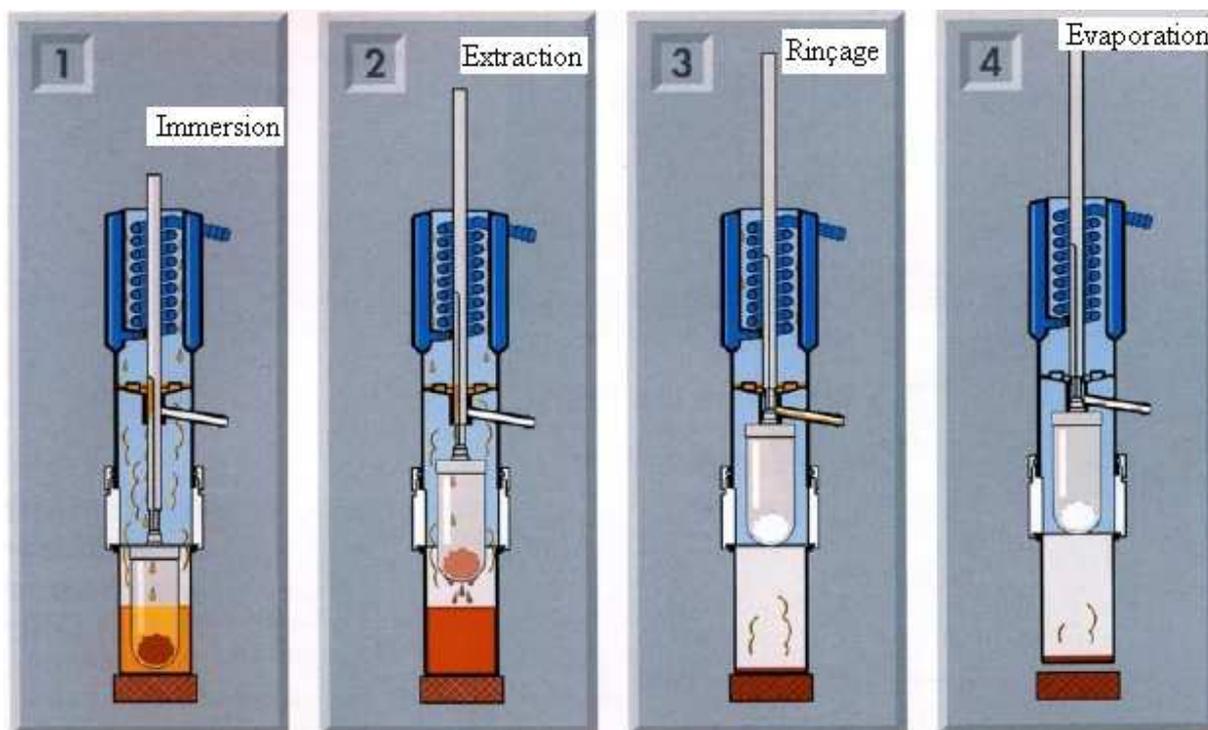


Fig. 2.9. Systeme Soxtec[77,78]

8.1.3. *La percolation* : consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier épais et poreux ou une pochette de papier filtre.

Les procédés, cités au dessus, sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvant organique. Ces dernières années ont été marquées par le développement de méthodes d'extraction alternatives qui font intervenir des fluides compressés comme agents extracteurs [79].

8.1.4. *L'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)* : La PLE, dont une des variantes les plus connues est l'extraction par solvant accéléré (Accelerated Solvent Extraction, ASE), est une technique d'extraction solide-liquide qui a la particularité d'utiliser des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au dessus du point d'ébullition des solvants [80]. Cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction plus rapide et plus efficace. L'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions solvants-matrices-molécules plus faibles. De plus, les taux de diffusion deviennent plus rapides à température élevée ce qui diminue le temps d'extraction. La pression force le solvant à passer à travers les pores de la matrice et ainsi atteindre des composés jusqu'ici inaccessibles. Par ailleurs, le processus d'extraction, constitué de plusieurs cycles d'extraction, engendre

l'introduction de solvant propre augmentant le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide, ce qui améliore le transfert de masse et augmente le taux d'extraction [79].

8.1.5. *L'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction)* : La SWE est une variante de l'ASE dans laquelle de l'eau chaude est utilisée à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau), et c'est sous l'effet de fortes pressions que l'eau est maintenue sous sa forme liquide [81,82]. L'eau à température ambiante est un solvant polaire qui possède une permittivité, ou constante diélectrique (ϵ'), de 75.5. Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue et sa constante diélectrique devient équivalente à celle du méthanol ($\epsilon' = 33$) ou de l'éthanol ($\epsilon'=24$) [83]. Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non polaires sans utiliser de solvants organiques.

8.1.6. *L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction)* : L'extraction par les fluides supercritiques s'est considérablement développée ces dernières années et a fait l'objet de très nombreuses publications scientifiques. Reverchon et De Marco [84] ont publié une revue sur l'utilisation de cette technique pour l'extraction et le fractionnement des matières naturelles végétales.

Les fluides supercritiques ont des propriétés différentes de celles d'un gaz ou d'un liquide, comprises entre les deux. Ils ont ainsi une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au fluide liquide, ce qui facilite leur pénétration dans des milieux poreux [85].

La SFE est principalement utilisée avec le CO₂ supercritique. Le terme supercritique signifie que le CO₂, sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite [79].

En plus du coût de l'appareillage, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par CO₂ supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules apolaires et qui nécessite l'ajout de co-solvants comme le méthanol ou l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires [79].

Les conditions d'obtention du CO₂ supercritique sont assez faciles à atteindre (303°K, 73,8 bar), alors que pour l'eau puisqu'il faut atteindre une température de 374,2°C et surtout une pression de 218 bar. Pour ces raisons, l'utilisation du CO₂ comme fluide supercritique s'est imposée. La température opératoire permet ainsi d'extraire des constituants sans les dénaturer et

en conservant les qualités biologiques et/ou organoleptiques. De plus, l'extrait sera exempt de tout solvant à pression et température ambiante.

De plus le CO₂ est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures [86]

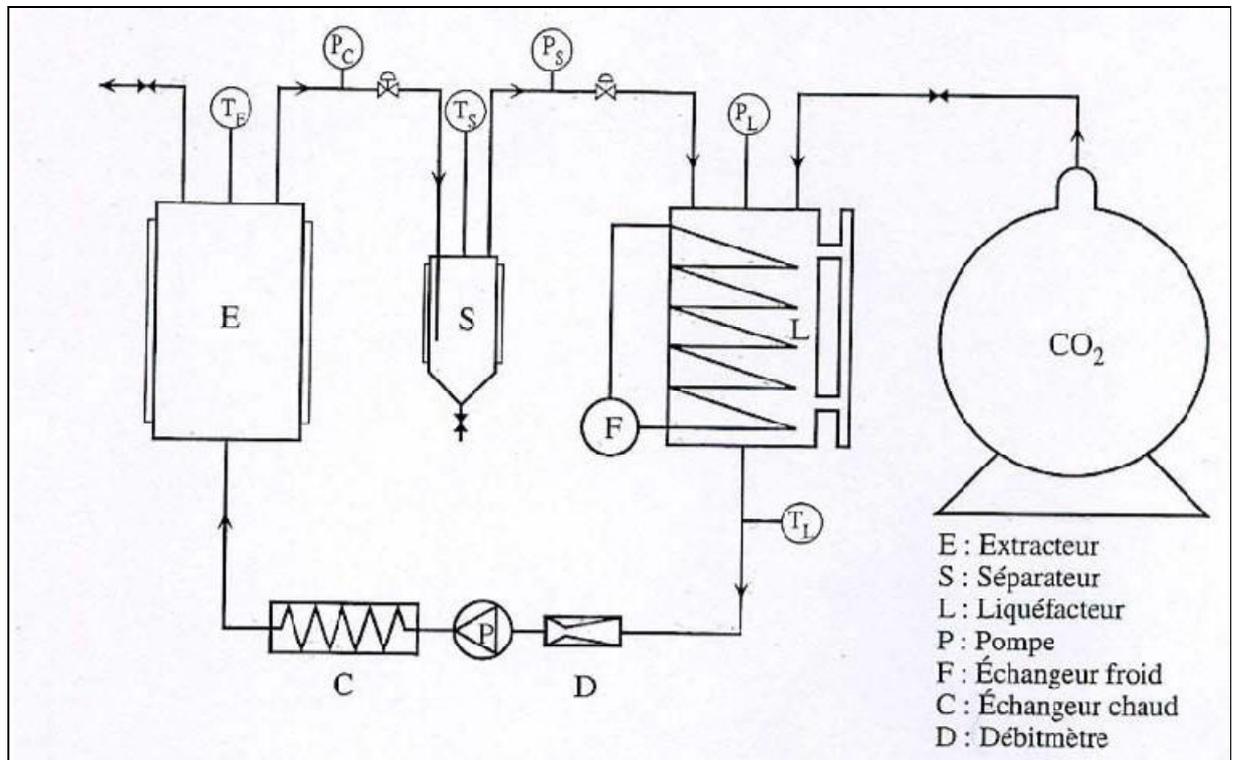


Fig.2.10 : Schéma du système d'extraction CO₂ des solides [87].

8.1.7. *Extraction par micro-ondes* : En 1986, Ganzler *et al.* [88] furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle. En 1990, Paré *et al.* [89] ont proposé d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal [85]. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [90].

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [91-94].

8.1.8. *Extraction liquide- liquide* : L'extraction solide –liquide est souvent suivie par une ou plusieurs autres, à la différence de la première, ce sont des extractions liquide-liquide effectuées dans des ampoules à décanter. L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. Elle consiste à faire passer un produit dissous dans une phase liquide, appelé le

soluté, dans une seconde phase liquide non miscible avec la première. En pratique, les solutés sont souvent dans une phase aqueuse. Un solvant organique est utilisé pour les extraire. Le choix du solvant d'extraction devient dès lors impératif [95].

Les solvants *apolaires*: possédant un moment dipolaire permanent nul. Par exemple, le benzène, les hydrocarbures: alcanes ramifiés ou linéaires, alcanes cycliques, alcènes, etc.

Les solvants *protiques*: possédant un ou plusieurs atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'eau, le méthanol, l'éthanol, etc.[96].

Les solvants *polaires aprotiques*: possédant un moment dipolaire non nul et dénué d'atomes d'hydrogènes susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'acétonitrile (CH_3CN), le diméthylsulfoxyde (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), le tétrahydrofurane (THF, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), etc.

-L'affrontement à l'éther du pétrole permet d'extraire les impuretés, surtout les lipides et la chlorophylle, qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques.

-L'affrontement à l'éther diéthylique permet d'isoler les composés phénoliques simples tels que les acides phénoliques et les flavones lipophiles. Il permet aussi d'extraire les tannins monomériques présents dans les extraits acétoniques [96].

-L'affrontement à l'acétate d'éthyle entraîne les aglycones, les mono-Oglycosides, les di-Oglycosides présents dans les extraits éthanoliques et les tannins dimériques des extraits acétoniques [96].

-L'affrontement avec le butanol n'est fait que pour les extraits acétoniques, permettant ainsi d'entraîner les tannins trimériques, oligomériques et une partie des polymériques.

-L'affrontement au dichlorométhane pour obtenir un extrait riche en composés moyennement polaires (flavanones, isoflavones) [96].

-Le méthanol est le solvant le plus fréquemment utilisé, il a été utilisé pour extraire les flavanones, flavones, les flavones glycosidiques et les méthoxyflavones. Le méthanol 70-80% a donné un bon rendement dans l'extraction des flavones, flavonols et les catéchines [96,97].

L'usage du mélange (méthanol/eau) à (50:50) est suffisant pour avoir une bonne extraction des glycosides [97].

Cependant, vu la diversité des combinaisons hétérosidiques, certains groupes de flavonoïdes tels que les flavones et flavonols ne sont pas caractérisés comme des composés intacts, mais sous leurs formes aglycones et c'est pour cette raison qu'une procédure d'hydrolyse préalable pour casser les liaisons glycosidiques est nécessaire.

Il faut noter aussi qu'en présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes [96]:

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ;

- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde ;
- des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques.

Tab.2.5 : *Quelques propriétés des solvants utilisés en phytochimie*[96].

Solvant	Indice de Polarité	T d'ébullition (°C)	UV(nm) cutoff	Solubilité dans l'eau (%v/v)
heptane	0.0	98	200	0.0003
hexane	0.0	69	200	0.001
pentane	0.0	36	200	0.004
cyclohexane	0.2	81	200	0.01
trichloréthène	1.0	87	273	0.11
tétrachlorométhane	1.6	77	263	0.08
di-iso-propyl Ether	2.2	68	220	
toluène	2.4	111	285	0.051
xylene	2.5	139	290	0.018
metyl-t-butyl Ether	2.5	55	210	4.8
benzène	2.7	80	280	0.18
éther diéthylique	2.8	35	220	6.89
dichlorométhane	3.1	41	235	1.6
1-2dichloroethane	3.5	84	225	0.81
acetate de Butyle	3.9	118	215	7.81
Iso-propanol	3.9	82	210	100
propan-1-ol	4.0	97	210	100
n-butanol	4.0	125	255	0.43
tetrahydrofurane(THF)	4.0	65	215	100
chloroforme	4.1	61	245	0.818
acetate d'éthyle	4.4	77	260	8.7
butanone	4.7	80	229	100
dioxane	4.8	101	215	100
méthanol	5.1	65	205	100
acétone	5.1	56	330	100
ethanol	5.2	78	210	100
acétonitrile	5.8	82	190	100
acide éthanoïque	6.2	118	230	100
diméthylformamide(DMF)	6.4	155	268	100
diméthylsulfoxyde(DMSO)	7.2	189	268	100
eau	9.0	100	200	100

8.1.9. *Facteurs influençant l'efficacité de l'extraction par solvant* [75] : Les facteurs qui contribuent à l'efficacité de l'extraction par solvant sont : Le type de solvant; le PH; la température; le nombre d'étapes d'extraction; le volume de solvant et la taille des particules de l'échantillon.

-*Nature du solvant* : Les solvants les plus largement utilisés pour l'extraction des flavonoïdes (les polyphénols en général) sont le méthanol et le mélange méthanol/eau; d'autres solvants sont utilisés comme l'acétone et l'acétate d'éthyle, mais ils fournissent souvent un faible rendement.

- *PH d'extraction* : Cela détermine le degré de solubilité des composés solubles et influence la possibilité de solubilisation des fractions hydrolysables. En effet, à un pH 1.5, la solubilité de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée. D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L et 0,5 g/L[75].

-*Température* : L'élévation de température améliore l'efficacité d'extraction. Étant donné que la chaleur rend les parois cellulaires plus perméables et augmente les coefficients de solubilité.

-*Nombre d'extraction et le volume du solvant*: L'efficacité d'extraction augmente avec le nombre d'extractions réalisées; par exemple, il sera plus efficace d'utiliser quatre extractions avec 50 ml de solvant que d'utiliser une seule avec 200ml de solvant. Des rendements quantitatifs sont obtenus en utilisant de 3 à 5 extractions du matériel végétal original.

-*la taille des particules* : L'homogénéisation favorise le processus d'extraction, en augmentant le contact particule / solvant.

8.2. Séparation et purification : Les extraits végétaux sont généralement des mélanges complexes pouvant contenir plusieurs dizaines de composés, voire des centaines, dont la valorisation et la commercialisation nécessite une étape préalable d'analyse fine (identification et quantification des constituants) [98,99].

Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des produits naturels telles que la recristallisation et la chromatographie.

8.2.1. La recristallisation: C'est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides.

Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid [100].

Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid.

8.2.2. *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, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte, soit de leur absorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase dans le cas où les deux phases sont des liquides.

Il existe plusieurs méthodes de séparation chromatographique en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode.

8.2.2.1. *La chromatographie sur couche mince (CCM)* : La CCM est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel [101].

En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique utilisée sous sa forme préparative, est souvent très avantageuse car la transposition à partir de C.C.M analytique est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures. Cette méthode permet la plupart du temps d'obtenir des produits purs.

8.2.2.2. *La chromatographie sur papier (CP)* : Il s'agit de la méthode chromatographique la plus ancienne permettant de séparer des mélanges complexes de composés polaires [101], comme les glycosides. La chromatographie sur papier Wattman reste couramment employée, en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de son efficacité de séparation. La CP sert à la fois de technique d'analyse et de méthode de purification des composés présents dans un extrait végétal [101].

Elle est basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont [102,103]:

- L'acide acétique 15 et 30 % constituant des systèmes aqueux ;
- Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (B /A/W) (4 /1/ 5) ;
- Méthanol / Acide acétique/ Eau. (M/A/W) (4/1/5) ;
- Tertiobutanol / Acide acétique/ Eau. (*t*-B/A/W) (4/1/5) constituant des systèmes organiques.

Les systèmes de solvants utilisés contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer les séparations et pour éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules.

8.2.2.3. *La chromatographie liquide sur colonne (CC)* : La C.C peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, par le phénomène d'adsorption, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes [104].

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes, par une phase stationnaire. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface (liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals) entre l'adsorbant et la molécule adsorbée. Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire est contenue dans une colonne. L'éluant qui peut-être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. Il peut-être un solvant unique ou un mélange de solvant [101].

Sous l'action de l'éluant et des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorbant, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard les unes par rapport aux autres pendant la migration. Elles vont donc se présenter avec un certain retard en sortie de colonne. L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale. Les différentes fractions sont collectées dans des erlenmeyers ou dans des piluliers [104].

La CC est adaptée à la purification de quantités importantes de produits, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, elle présente certains inconvénients: De grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution, la durée de l'élution est généralement très grande, la détection des composés exige une attention constante.

8.2.2.4. *La chromatographie liquide haute performance (HPLC)* : L'HPLC est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne sans en présenter les inconvénients que sont: la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire. C'est un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en oeuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion [101].

L'HPLC a un champ d'application qui recouvre une grande partie de l'analyse des substances naturelles, spécialement l'analyse des composés de masse moléculaires à la fois grande et même polaire. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise, sur la sélectivité entre les composés phénoliques, au point qu'elle est devenue la méthode d'analyse la plus connue pour ces composés phénoliques [101].

Les composés phénoliques d'origine naturelle ont la propriété d'être solubles dans les solvants polaires, ce qui rend possible l'utilisation de la phase inverse en HPLC (RP-HPLC) pour leur analyse [105].

Sous les conditions chromatographiques utilisant l'analyse HPLC, la figure (Fig.2.11) illustre les chromatogrammes de quelques flavonoïdes [105].

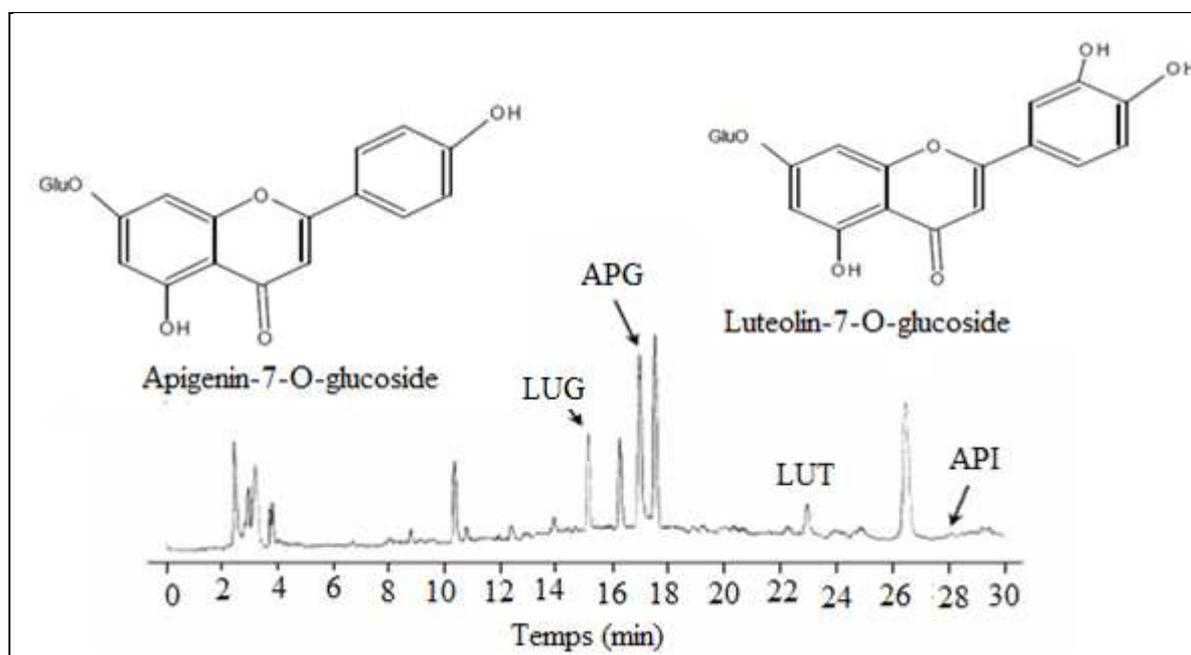


Fig.2.11 : Chromatogramme HPLC de quelques flavonoïdes : Apiginine-7-O-glucoside (APG) ; Apigénine (API) ; luteoline-7-O-glucoside (LUG) ; luteoline (LUT) [105].

8.2.2.5. *La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et les indices de rétention* : Depuis 1955, avec la mise sur le marché du premier appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG), grâce aux progrès de l'instrumentation (colonne capillaire, détecteurs, ...) et à sa relative facilité d'emploi, cette technique de séparation est l'une des plus utiles et des plus répandues dans les laboratoires d'analyse [85].

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc) [85].

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature physique des phases (mobile et stationnaire), (Tableau. 2.6).

Tab.2.6: Quelques méthodes chromatographiques [106]

Chromatographie en phase liquide		
	Type	Phase stationnaire
liquide/solide	adsorption	solide poreux
	échange d'ions	solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile
	exclusion (filtration sur gel, perméable au gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
liquide/liquide	Partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	Partage phase inversée	solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non polaires
Chromatographie en phase gazeuse		
	Type	Phase stationnaire
gaz/solide	adsorption	solide poreux
gaz/liquide	partage (partition)	dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide
		dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support
Chromatographie en phase supercritique		
gaz supercritique/solide	interactions analyte / éluant	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide
gaz supercritique/liquide	interactions analyte / éluant	Espèce organique liée chimiquement à une surface liquide

On peut dire que l'application des techniques chromatographiques, d'une manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts (purs et propres) pour l'opération d'identification structurale.

9. Analyses structurales

9.1. Comportement chromatographique (fluorescence et facteur de retardement) : Afin d'arriver à identifier les produits isolés, une série de méthodes est utilisée et appliquée en fonction de la nature de ces produits. Ainsi, pour les flavonoïdes, les valeurs des R_f dans des systèmes de solvants connus et la fluorescence du produit en question permettent d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément la suite des opérations.

Ces deux opérations sont appliquées d'une manière systématique pour ce genre de produits naturels avant même les analyses physiques proprement dites [107].

9.1.1. *Fluorescence sous lumière de wood* : L'absorption des substances flavoniques sous lumière de wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Elle permet de faire la distinction entre les différentes classes de flavonoïdes très rapidement. C'est le cas par exemple des deux aglycones de flavone de base en l'occurrence l'apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) et de la lutéoline (5,7,3',4'- tetrahydroxyflavone) et leurs homologues flavonols qui ont des fluorescences noir-violette et jaune respectivement. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [107].

Tab. 2.7 : Prédiction de la structure à partir de la fluorescence sous lumière de Wood [107]

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5,6, 7 ou 5, 7, 8 trihydroxy-flavone, Flavonol avec 3-OR Chalcones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH, Chalcones, Flavanones
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH , Flavone 5-O- substitué Flavonols avec OR en 3 sans OH en 5
Jaune Pâle	Dihydroxyflavone
Violette	5,4'-dihydroxyflavone Flavone 3-O substituée et 5-OH, 4'-OH 6-hydroxy ou 8-hydroxyflavone, chalcone, isoflavone, dihydroxyflavonols, flavanones

9.1.2. *Effet de facteur de retardement (Rapport frontal)* : Ce facteur symbolisé par Rf est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part.

La valeur du Rf varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différentes substitutions du squelette flavonique[107,108]. Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange.

Tab. 2.8 : la relation entre le Rf et la structure flavonique[107,108].

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupes hydroxyles	Rf diminue dans les systemes de solvants organiques et augmente dans les systemes de solvants aqueux
Méthylation des hydroxyles	Rf augmente dans les systemes de solvants organiques et diminue dans les systemes de solvants aqueux
Méthylation d'un OH en C5	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Glycosilation	Rf diminue dans les systemes de solvants organiques et augmente dans les systemes de solvants aqueux
Hétérosides de flavones avec 3-OH	Rf nul dans l'eau

Les indications que peuvent apporter ces deux propriétés (Rf et fluorescence) constituent pour tout phytochimiste qui s'intéresse aux structures des flavonoïdes un atout considérable. En effet, alors que la fluorescence permet de distinguer un flavone d'un flavonol, les valeurs des Rf effectués sur des systèmes chromatographiques spécifiques ou conventionnels peuvent si elles sont bien utilisées, apporter beaucoup d'indications.

Il est à signaler qu'on peut analyser, quantitativement, les flavonoïdes par des différentes méthodes de dosage telles que le dosage par spectrophotométrie UV, dosage par colorimétrie de Folin, dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ... [18]

Le dosage par UV est une méthode instrumentale utilisée pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution, elle est basée sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission d'un rayonnement par les espèces à doser [78].

Le dosage par colorimétrie s'effectue au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide chlorogénique) permet de déterminer la quantité de phénols totaux présente dans l'extrait exprimée en mg d'équivalent acide chlorogénique [18].

Pour le dosage par HPLC, l'identification des flavonols se fait en fonction de leur temps de rétention, par comparaison avec des standards connus. La détection des molécules est assurée par des mesures spectrophotométriques entre 200 et 400 nm. La mesure de l'aire du pic des flavonols permet d'en déterminer la quantité. L'utilisation d'un détecteur à barrettes de diode permet de confirmer l'identité des composés et d'évaluer leur pureté [8,11].

9. 2. Techniques spectroscopiques

9.2.1. Spectroscopie UV-Visible : C'est une méthode très importante pour la détermination des composés flavoniques. Son importance réside dans : l'utilisation des faibles quantités de produit, la facilité d'analyse et l'obtention d'informations très importantes sur la position des hydroxyles sur le squelette flavonique.

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que chaque produit a un spectre d'absorption dans le méthanol et l'addition des réactifs provoque un changement dans ce spectre donne des indications précises sur le squelette flavonique.

En général, une bonne exploitation des données de cette technique additionnée aux valeurs des Rf dans les systèmes de solvant appropriés conduit à une approche structurale qui pourrait être

complète si l'on tient compte de la couleur de la fluorescence de ce type de composés une fois exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$).

a/ *Types de bandes dans les flavonoïdes* : On distingue deux types de bandes [101,108] :

-La bande I correspond à l'absorption, dans la gamme de 300-500 nm, du système cinnamoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle C4 avec le noyau B.

-La bande II correspond à l'absorption du système benzoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A. Cette bande est due essentiellement à l'absorption du système chromophore du cycle A dans la gamme de 240-284nm.

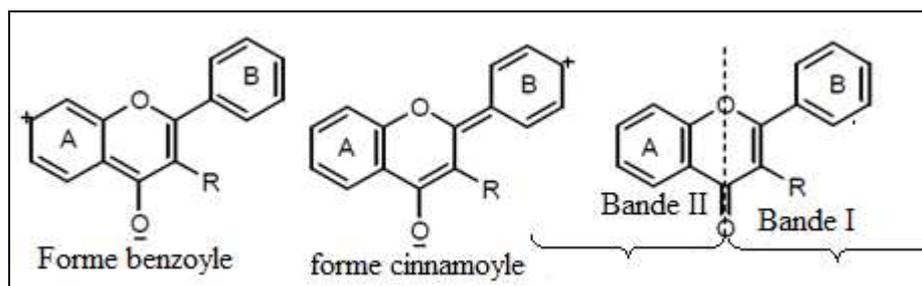


Fig.2.12. les formes limites et les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique[101,108]

Le déplacement exact et l'intensité des deux bandes I et II du spectre effectué dans le méthanol illustrent la nature de la structure du flavonoïde ainsi que sa substitution, conformément au tableau 2.9.

Tab.2.9 : Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV pour les différentes classes de flavonoïdes[101,108]

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250 - 280	310 - 350	Flavone
250 - 280	330 - 360	Flavonol(3-OH substitué)
250 - 280	350 - 385	Flavonol (3-OH libre)
245 - 275	310 - 330 (épaulement)	Isoflavone (5-deoxy-6,7-dioxygéné)
275 - 295	300 - 330 (épaulement)	Flavone et dihydroflavonol
230 - 270	340 - 490	Chalcone
intensité faible	380 - 430	Aurone
270 - 280	465 - 560	Anthocyane et anthocyanidine

Parmi les exemples cités, il est clair que, le groupe hydroxyle à la position 7 et le groupe méthoxy à la position 4' n'ont aucune influence sur la bande (II). Seulement un groupe en position 5 peut changer la valeur d'absorption.

-Quand le groupe méthoxy introduit aux positions 3' et 4' du cycle B et le flavone a un groupe hydroxyle à la position 7, la bande (II) est changée vers la gamme 237nm.

-Quand le groupe méthoxy est introduit en trois positions du cycle B, la bande (II) peut disparaître ou être affectée par un effet bathochrome.

Pour les flavonols, une augmentation dans le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la Bande I de 3 nm à 10 nm. Par exemple, les longueurs d'onde d'absorption

de la galangine (aucun groupe OH sur le cycle B), du kaempférol (un groupe OH en position 4') et de la quercétine (deux groupes OH en positions 3' et 4') sont respectivement 359 nm, 364 nm et 367 nm (Figure 2.13).

De même, le déplacement de la bande d'absorption est fortement influencé par l'ajout d'acide de lewis ou de base, une méthode très utilisée par le positionnement des groupements hydroxyyles (OH) dans les cycles des flavonoïdes [97].

Les chaînes saturées ont peu d'influence sur le spectre d'absorption, et tous les composés possédant un groupe non saturé déterminé ont des spectres très voisins (par exemple, toutes les cétones, caractérisées par le groupe C=O, absorbent aux environs de 280 nm). Les spectres « électroniques » sont profondément modifiés par certaines particularités de structure, comme la conjugaison des liaisons multiples; la position en longueur d'onde du maximum d'absorption et l'intensité de la bande sont simultanément modifiées.

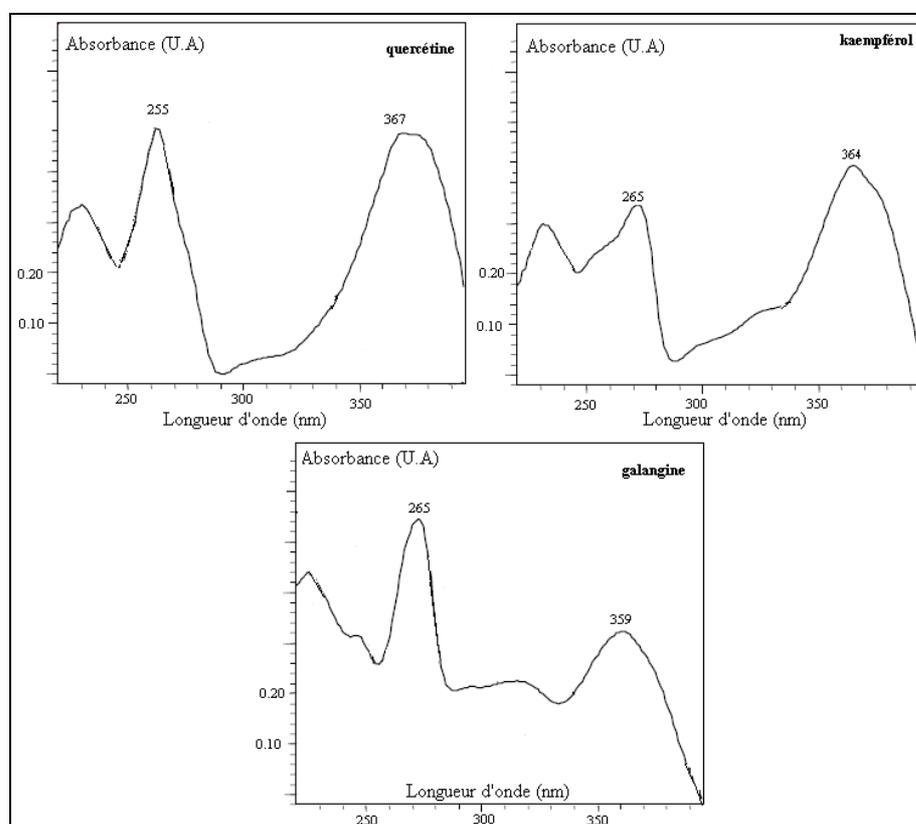


Fig. 2.13: Spectres UV/Visible de flavonols (Quercétine, kaempférol, Galangine) [109]

b/ Addition de réactifs : Outre la caractérisation du spectre d'absorption du produit, généralement dans du MeOH, des informations additionnelles importantes peuvent être obtenues par l'utilisation de réactifs de déplacement. Ceux-ci complexent de manière variable les composés phénoliques en solution et provoquent des déplacements caractéristiques des maxima.

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, AlCl₃, AlCl₃+HCl, NaOAc et NaOAc+H₃BO₃. Ces réactifs réagissent

avec les groupements hydroxyles par formation de sels et de complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

-*L'addition de NaOH*: L'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7. Dans le cas des isoflavones hydroxylés sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [102]

- *L'addition de NaOAc* : Ce réactif sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui de la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des positions 3, 7 et 4' [110].

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7, ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [102].

-*L'addition de H₃BO₃* : Le H₃BO₃ est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence de systèmes ortho dihydroxyle sur le cycle B ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) à cause des complexes formés. L'effet observé est un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol [103].

-*L'addition de AlCl₃*: L'addition de AlCl₃ à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et la fonction carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et la fonction carbonyle [108]. Ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I.

-*L'addition de HCl* : L'addition de HCl dans ce même échantillon provoque la disparition des complexes instables (complexe formé entre deux hydroxyles) et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle). Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence d'AlCl₃ et bien évidemment un effet bathochrome moins important par rapport au spectre dans le méthanol pris comme référence [110].

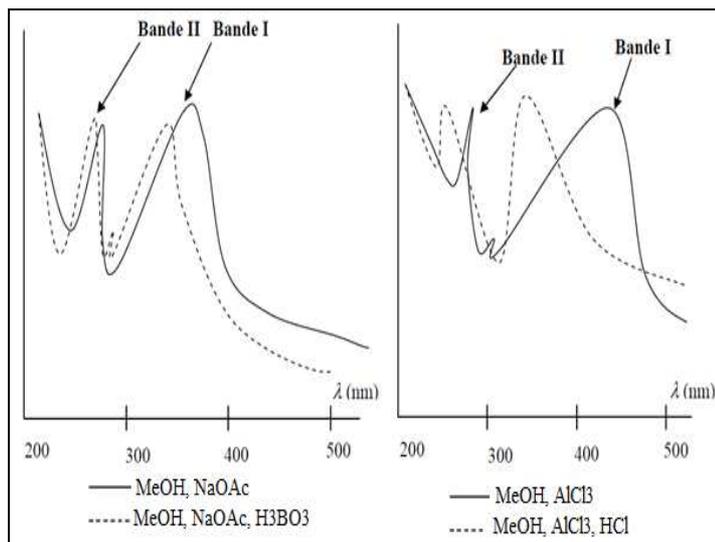


Fig.2.14 : spectres UV-Vis de flavones [108]

Fig.2.15 : spectres UV-Vis de flavonol[105]

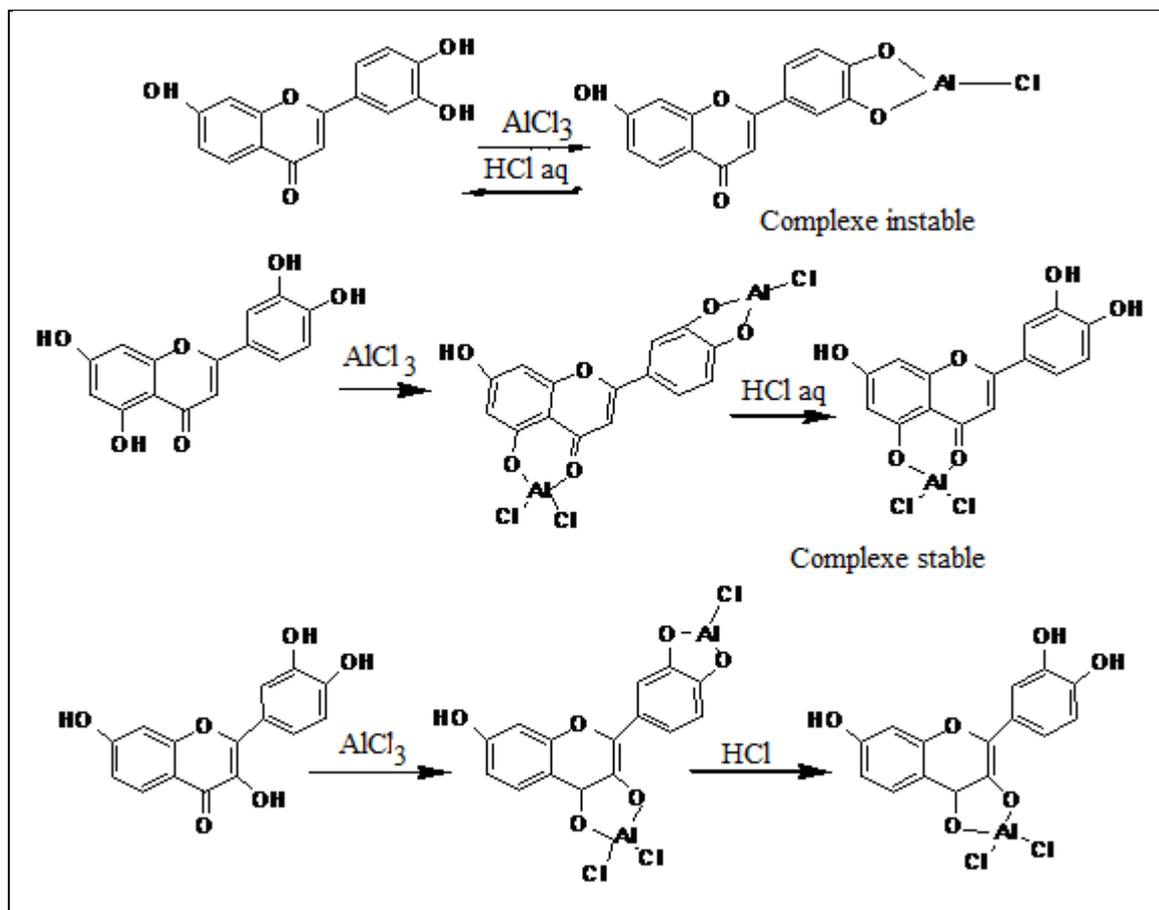


Fig.2.16 : formation des différents types de complexes après addition d'AlCl₃ et en présence de HCl [101,108]

Le tableau 2.10 résume les informations structurales qui peuvent être obtenues en utilisant les différents réactifs de déplacement.

Tab. 2.10 : Informations structurales provenant des déplacements induits par les réactifs [101,108]

réactifs	déplacement en (nm)		interprétation
	bande I	bande II	
MeOH	310 – 350 352-385 350 – 380	250 - 280 250 - 280 250 – 280	Flavones Flavonols (3-OH substitué) Flavonols (3-OH libre)
MeOH + NaOH	+40 à 60 (BI) avec stabilité d'intensité optique +50 à 60 (BI) avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Apparition d'une 3eme bande entre BI et BII Absence de bande entre 320 - 335 Transformation de bande I en une inflexion Décomposition lente		4' - OH 3 OH et 4' OR 4' - OR 7 - OH 7 - OR 5 - OH (Un seul hydroxyle libre) 3,4' di-OH ou ortho di-OH sur le noyau A (6,7 ou 7,8)
AlCl ₃ + MeOH	+20 à 45 (BI) +60 (BI)		5 - OH 3 - OH
AlCl ₃ +HCl+ MeOH	-20 à -40(BI) -20 à -25(BI)		Ortho di-OH sur le noyau B Ortho di- OH sur le noyau A (en plus ortho di-OH sur le noyau B)
	+17 à 20(BI) +35 à 55(BI) +50 à 60(BI)		5 - OH(avec 6-oxygénation) 5 - OH flavone et 3-OMe flavone 3 - OH avec ou sans 5- OH
NaOAc + MeOH	+5 à 20 (BII) Déplacement très faible(BII) Diminution d'intensité avec le temps(BII) le spectre se décompose avec le temps(BII)		7 - OH 7 - OR 6,7; 7,8 ou 3',4' di OH 5,6,7 ; 5,7,8 ou 3,3',4' -tri-OH
NaOAc + MeOH + H ₃ BO ₃	+12 à 36 (BI) +5 à 10 (BI)		3',4' di OH 6,7 ou 7,8 di-OH

9.2.2. *Spectrométrie infrarouge*: Les radiations infrarouges se situent dans la partie du spectre électromagnétique comprise entre la région visible et celle des micro-ondes. La région la plus utile pour l'analyse de molécules organiques est celle située entre 4000 et 400 cm⁻¹. L'absorption de ces radiations par un composé provoque une variation de l'énergie de rotation et de vibration des liaisons chimiques de ce composé, qui peut être détectée (détecteur à thermocouple). On observe ainsi au niveau du spectre une série de bandes rotato-vibratoires dont le nombre d'onde, inverse d'une longueur d'onde et exprimé en cm⁻¹, dépend des masses relatives des atomes, de la constante de force des liaisons ainsi que de la géométrie des atomes [111].

Les appareils anciens, à monochromateur, procédant par balayage et enregistrements successifs dans la gamme de nombres d'onde à analyser. Les systèmes plus récents sont des spectromètres infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), où la gamme complète des radiations passe simultanément à travers l'échantillon. Le résultat est un interférogramme, qui est converti mathématiquement en spectre classique infrarouge. Cette technique permet à la fois un temps

d'analyse court, une excellente résolution et l'obtention de résultats faciles à traiter [111]. Elle peut également permettre de travailler sur des quantités plus restreintes de produit.

Tab.2.11 : Quelques valeurs de nombre d'onde des bandes caractéristiques

Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité
Cdi-H	Elongation	3300	m ou f
Ctri-H	Elongation	3030-3100	m
Ctri-H aromatiq	Elongation	3000-3100	m
Ctet-H	Elongation	2850-2970	F
Ctri-H	Elongation	2700-2900	m
O-H acide carboxylique	Elongation	2500-3200	F à m; large
C=O ester	Elongation	1735-1750	FF
C=O acide carboxylique	Elongation	1700-1725	F
C=C aromatique	Elongation	1450-1600	3 ou 4 bandes
Ctet-H	Déformation	1430-1470	F; 2 bandes
C-C	Elongation	1000-1250	F
Ctri-H de -HC=CH- (<i>E</i>)	Déformation	960-970	F
Ctri-H de -HC=CH- (<i>Z</i>)	Déformation	670-730	m
Ctri-H aromatique monosubstitué	Déformation	730-770 + 680-720	F; 2 bandes
Ctri-H aromatique orto-disubstitué	Déformation	735-770	F
Ctri-H aromatique méta-disubstitué	Déformation	750-800 + 680-720	Fet m; 2 bandes
Ctri-H aromatique para-disubstitué	Déformation	800-860	F
m : moyenne ; F : forte ; f : faible ; Ctet Tétraédrique sp ³ ; Ctri trigonal sp ² ; Cdi digonal sp			

9.2.3. *Spectrométrie de masse (SM)* : Cette technique permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [65], les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements sur la séparation des substituants entre le noyau A et le noyau B. Elle détermine aussi la nature et le site d'attachement des sucres dans les « O » ou « C » glycosides pour les flavonoïdes. En spectroscopie de masse les deux noyaux (A et B) gardent leurs structures et ne se fragmentent pas. A l'inverse de noyau (C) qui est considéré très faible, ce qui favorise le clivage des liaisons à ce niveau [105].

Ils existent différentes techniques en spectrométrie de masse dont les plus utilisées sont : la spectrométrie de masse à impact électronique (EI), spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB), spectrométrie de masse electrospray (ES).

Les mécanismes de fragmentation les plus courants impliquent la coupure entre deux liaisons carbone (C-C) du cycle C. Les ions fragments ainsi produits sont notés $^{i,j}A^{\pm}$ et $^{i,j}B^{\pm}$, ou A et B représentent les cycles A et B restés intacts, et *i* et *j* se réfèrent, quant à eux, aux liaisons du noyau C qui ont été rompues [79,112]].

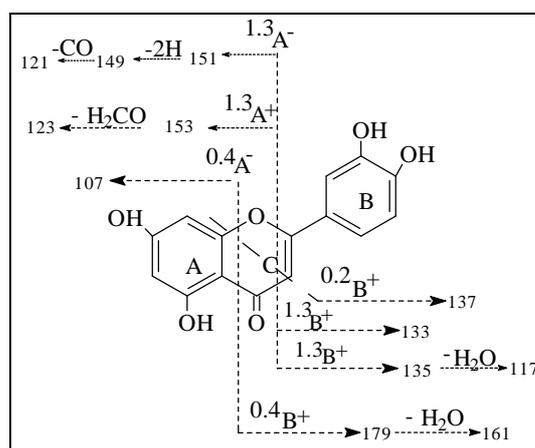


Fig. 2.17: Exemples de voies de fragmentation des flavonoïdes (Lutéoline) obtenues en MS/MS[79].

La fragmentation des flavonoïdes est explicable par des mécanismes rétro-Diels-Alder (RDA). Les réactions de RDA apparaissent sur des cycles à 6 carbones contenant au moins une double liaison. Une RDA du cycle C entraîne préférentiellement une coupure entre les liaisons 1 et 3 et forme ainsi deux ions fragments, généralement majoritaires, notés $^{1,3}A^{\pm}$ et $^{1,3}B^{\pm}$. D'autres ruptures de liaisons peuvent intervenir selon le mode d'ionisation et la classe de molécules étudiées [112].

Dans le cas de pertes neutres, tels que H_2O ou CO , les ions produits sont désignés par la combinaison de la nomenclature $^{i,j}A^{\pm}$ (ou $^{i,j}B^{\pm}$) et de la perte neutre, par exemple $[^{1,3}A-H_2O]^{\pm}$.

-Selon leurs structures, les flavonoïdes-*O*-glycosylés peuvent subir à la fois un clivage hétérolytique et homolytique permettant de déterminer la nature du sucre et sa position sur la génine [113]. Le clivage hétérolytique produit une coupure de la liaison osidique avec réarrangement des protons. L'ion fragment Y_0^{\pm} correspondant à la génine est alors formé et l'élimination du sucre produit des pertes caractéristiques qui permettent de déterminer facilement la nature de celui-ci. Par exemple les pertes de 162, 146, 132 et 308 u sont respectivement spécifiques de l'élimination d'un hexose, d'un déoxyhexose, d'un pentose et d'un disaccharide [114]. Le clivage homolytique de liaisons *O*-glycosidiques produit l'ion radicalaire de la génine $[Y_0 - H]^{\pm}$. Hvattum et Ekeberg [113] ont étudié en mode négatif l'abondance de cet ion radicalaire pour différents types de flavonoïdes-*O*-glycosylés. Pour les flavonols, ils ont démontré que la proportion relative de $[Y_0 - H]^{-}$ augmentait avec le nombre de groupements hydroxyles sur le noyau B, et que la nature et la position des sucres sur la génine avait une influence sur la formation de cet ion radicalaire. Une glycosylation en position 7 conduit à une proportion plus importante de $[Y_0 - H]^{-}$ par rapport à une glycosylation en position 3[79].

9.2.4. *Résonance magnétique nucléaire (R.M.N)* : La résonance magnétique nucléaire constitue une des techniques d'analyse moderne et les plus efficaces pour la détermination de la structure et de la stéréochimie des molécules organiques complexes [115,116]. Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

9.2.4.1. *RMN du ^1H* : La réalisation d'un spectre de RMN du ^1H est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes. En RMN du ^1H , trois informations sont importantes [115,116]:

-*Le déplacement chimique (δ)* : C'est une fréquence exprimable en Hertz (Hz), qui est en pratique toujours présentée sous la forme d'une échelle de ppm (rapport de la fréquence de résonance sur celle du champ magnétique B_0), qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil. Elle donne une indication sur la nature des groupements chimiques présents.

-*L'intégration* : L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. La prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule.

-*Le couplage* : Chaque proton est couplé avec ses voisins immédiats non équivalents dans la molécule. Ceci se traduit par un changement de forme des signaux observés. Le signal d'un proton indique le nombre de protons avec lesquels il est couplé ($n+1$ raies pour n voisins) et peut même donner des renseignements d'ordre structural, *via* l'écartement de ces raies, mesuré en Hz et appelé constante de couplage (J).

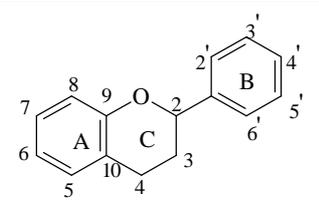
Concernant l'analyse des flavonoïdes, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) permet de visualiser les relations existant entre les protons des différents noyaux et déduire leur degré de substitution.

Elle permet également de repérer les groupements méthoxylés, de dénombrer les sucres et d'envisager leur mode de liaison à la génine.

a/ Analyse des signaux provenant des protons de la génine : Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

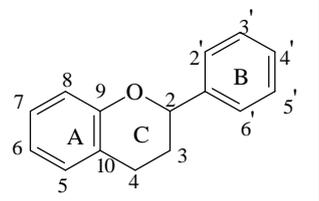
-*Protons du noyau A* : Lorsque le noyau A est disubstitué par des OH en 5 et 7, les protons H-6 et H-8 présentent deux doublets, respectivement, entre 6.16 et 6.25 ppm avec une constante de couplage $J = 2,5$ Hz et entre 6.39 et 6.56 ppm avec la même constante de couplage. La substitution des OH en positions 5 et/ou 7 conduit au déblindage des deux protons voisins [117]. Selon les substitutions possibles. Les résonances et les multiplicités des protons H5, H6 et H8 sont résumées dans le tableau suivant :

Tab.2.12 : déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau A [117]

	H5	H6	H8
	5-7 di -OH		6.00-6.20 ppm (d) (J=2.5Hz)
5-OH 7-hydroxy, glucoside		6.20-6.40 ppm (d) (J=2.5Hz)	6.50-7.00 ppm (J=2.5Hz)
5, 6, 7-OR (R=H ou sucre) 5, 7, 8-OR		6.3 (s) -	- 6.3 (s)
7-OR (R=H ou sucre)	8.00 ppm (d) (J=9.0Hz)	6.70-7.10 ppm (dd) (J=9Hz et J=2.5Hz)	6.70-7.10 ppm (d) (J=2.5Hz)

-*Protons du noyau B* : Le déplacement chimique des protons du noyau B se trouve entre 6,7-7,9 ppm. Ce déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C. Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8.5 Hz). Les protons H-2' et H-6' résonnent toujours à des champs inférieurs à ceux des protons H-3' et H-5'.

Tab.2.13 : déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau B [117]

	(J=8.5Hz)	
	H2', H6'	H3', H5'
4'-hydroxy Flavone	7.70-7.90 ppm (d)	6.50-7.10 ppm (d)
4'-hydroxy Flavonol	7.90-8.10 ppm (d)	6.50-7.10 ppm (d)
3',4'dihydroxy	7.20-7.90 ppm	-----
3',4',5' tri hydroxy	6.50-7.50 ppm (s)	-----

-*Protons du cycle C* : Le proton H-3 d'une structure flavone résonne entre 6.20 et -6.40 ppm sous forme d'un singulet [117], pouvant être confondu avec les protons H-6 et H-8.

b/ Analyse des signaux provenant des protons aliphatiques :

- *Protons méthoxyle* : Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.5 et 4.5 ppm.

- *Protons du sucre : protons de la partie osidique* : Les déplacements chimiques des protons anomériques dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone.

Les protons correspondants à la partie osidique résonnent à des champs forts par rapport à ceux de la génine (3,5 – 4 ppm). Le proton anomérique (H-1'') résonne à champ faible par rapport aux autres protons à la partie osidique (4,2 à 6 ppm). L'intégration du signal qui est proportionnelle au nombre de protons qu'elle représente permet de déterminer le nombre de sucres, alors que la constante de couplage du proton anomérique permet de déterminer l'anomère α ou β connaissant la nature du sucre.

Le déplacement chimique du proton anomérique (H-1'') est basé sur :

- La nature du flavonoïde et du sucre.
- La position et le type de liaison entre le sucre et l'aglycone [118].

La constante de couplage entre le proton anomérique du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone s'il s'agit d'une position α ou β .

Le proton anomérique lié à un autre ose, devient relativement loin de l'influence du noyau flavonique, et résonne à champ plus fort que le proton anomérique lié à la génine. Il donne en général un doublet déblindé par rapport aux autres protons osidiques et sa constante de couplage est de $J=7\text{Hz}$ car il est toujours en position β d'après la biogénèse. Pour le rhamnose son proton anomérique donne un doublet aussi, mais sa constante de couplage est de $J=2.5\text{Hz}$ (position α). On peut aussi reconnaître le sucre rhamnose par le signal du groupement méthyle entre 0.8-1.2 ppm et avec une constante de couplage de $J= 6\text{Hz}$ [119].

9.2.4.2. Spectroscopie RMN ^{13}C : Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment gyromagnétique qui le rendent environ 5700 fois moins sensible que le proton [85, 120], le ^{13}C est préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants [115,116] :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du ^{13}C autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- Les spectres de RMN du ^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. En plus l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) résultant de ce découplage des protons produit une augmentation d'intensité du signal [121 ,122];
- Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (schématiquement, 240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notablement la résolution effective c'est-à-dire la dispersion spectrale [123];

- L'enregistrement des spectres de RMN du ^{13}C est réalisé à température ambiante. Cela évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;
- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et soumis à d'autres analyses.

Pour les flavonoïdes, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire permet de connaître, parmi autres [101] :

- La détermination de la position et le nombre des sucres liés à l'aglycone, ainsi que l'identification des liaisons (α ou β) C-sucre et O-sucre.
- L'identification des substituants oxygénés et acylés et leurs sites d'acylation.
- La position et le nombre de substituants méthoxyles sur le squelette flavonique.

Il faut signaler que la technique RMN à une dimension s'est avérée parfois insuffisante d'où la nécessité d'utiliser d'autres techniques notamment la RMN à deux dimensions.

Il résulte donc, de tous les points cités jusqu'ici qu'il est possible d'identifier par RMN du ^{13}C la plupart des molécules organiques, même dans les cas de molécules ayant des structures très proches [117,124].

10. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

10.1. Le couplage HPLC-UV : La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrettes de diodes (DAD, Diode Array Detector) [79].

Les composés phénoliques possédant tous un chromophore, leur analyse en ligne par (HPLC-DAD) permet donc d'obtenir des informations structurales et ainsi de réaliser un premier criblage des extraits bruts et/ou fractions [125, 126]. De plus, il s'avère que cette méthode de détection est rapide, reproductible, sensible et non destructive.

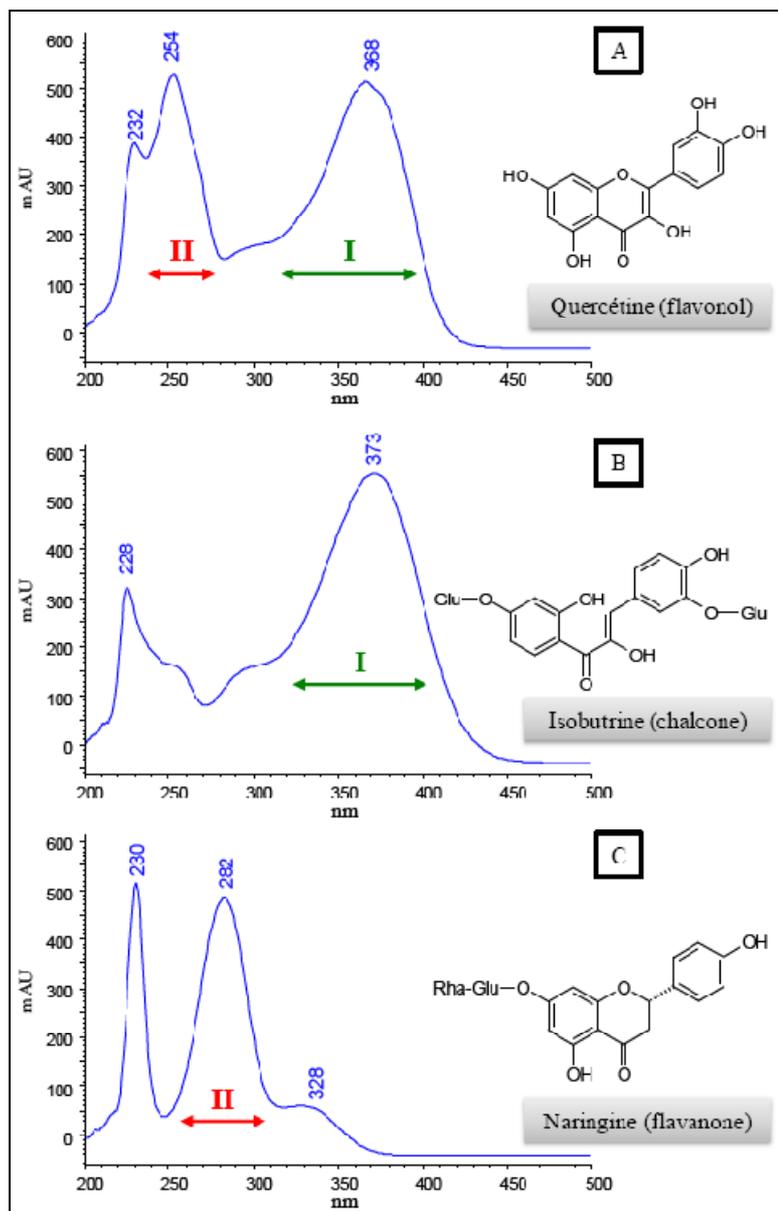


Fig. 2.18 : Spectres UV-vis de la quercétine (flavonol) (A), de l'isobutrine (chalcone) (B) et de la naringine (flavanone) (C) enregistrés entre 200 et 500 nm par HPLC-DAD [79].

10.2. Le couplage HPLC-MS : Depuis l'essor des procédés d'ionisation à pression atmosphérique, deux types de sources d'ionisation sont majoritairement utilisés pour l'analyse des composés phénoliques par HPLC-MS [127,128]: l'ionisation par électrospray (ESI, Electro spray Ionisation) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).

L'ESI repose sur l'introduction d'une solution aqueuse de l'échantillon à analyser dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif). Sous l'action combinée d'un gaz de nébulisation chauffé, qui évapore le solvant, et du champ électrique, des charges vont s'accumuler à la surface de l'effluent conduisant à la rupture de celui-ci et à la formation d'un spray de gouttelettes fortement chargées ou « cône de Taylor ». Les microgouttes ainsi formées vont progressivement diminuer par perte de molécules de solvant, puis éclater sous l'effet d'une

10.5. Le couplage CLHP-CPG-SM : Dans le couplage, CLHP-CPG-SM, la CLHP réalise une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent. Ce dispositif permet de supprimer ou de limiter le nombre de co-élutions et de ce fait une plus grande fiabilité dans l'identification de constituants [135].

Une étude comparative de standards de composés phénoliques et de flavonoïdes en chromatographie liquide (HPLC) et chromatographie liquide en phase gazeuse (GC) fut réalisée en utilisant plusieurs types de détecteurs : les détecteurs ultra violet à barrettes de diodes (UV.DAD) et électrochimique (EC) pour l'HPLC, et les détecteurs à ionisation de flamme (FID) et spectrométrie de masse (MS) pour la GC. Les résultats ont démontré que les limites de détection obtenues avec l'HPLC /EC étaient 2 à 50 fois plus élevés que celles obtenues avec l'HPLC/UV. Les résultats indiquent que les analyses en GC/FID pour les flavonoïdes sont plus performantes que celles obtenues par l'HPLC avec une meilleure séparation effectuée en moins de temps et un minimum de co-élution [136].

10.6. Le couplage CPG-IRTF : L'avènement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) autorisant une grande vitesse d'acquisition a permis de réaliser le couplage CPG-IRTF [137].

Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse [138]. Son efficacité a été démontrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables [139].

10.7. Le couplage CPG-SM : Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées [103,140].

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes [141,142].

Conclusion

L'intérêt de plantes, est lié aux différents principes actifs qu'elles renferment. On distingue parmi eux, les composés phénoliques dont de nombreux travaux ont été consacrés ces dernières années à l'étude de leurs propriétés chimiques et biologiques ainsi que de leurs mécanismes d'actions. Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques telles que les

flavonoïdes. La structure chimique de ces derniers leur confère une capacité très développée pour réagir avec plusieurs sortes de molécules.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet^-$).

Il convient de mettre en œuvre divers procédés d'analyse de flavonoïdes; parmi les quelles :

-*l'extraction par solvant*, fondée sur la différence de solubilité dans solvant donné, ou sur le partage des corps en présence entre deux solvants non miscibles.

-*la chromatographie*, fondée sur la différence d'affinité pour un adsorbant formant une phase distincte du mélange. Elle peut se pratiquer soit en phase gazeuse soit en phase liquide.

-*la mise en œuvre de nombreuses méthodes physiques*, parmi les quelles la résonance magnétique nucléaire et la spectroscopie de masse sont les plus utilisées.

Toutes ces techniques sont, à l'heure actuelle, à la disposition du chimiste, ce qui lui a permis d'explorer pleinement les structures complexes des composés naturels.

Éléments des références bibliographiques

- [1] Piquemal G. **2008.** "Les flavonoïdes" disponible sur (<http://www.biam2.org/www/cla-49523.html>) (consulté en avril **2012**)
- [2] Karaali A., Boyacioğlu D., Günez G. et Özçelik B. **2004.** "Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health" .STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university.Turkey.
- [3] Malesev D. et Kuntic V. **2007.** "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions". *Journal of the Serbian chemical society*, 72 (10): 921-939.
- [4] Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M. **2001.** "Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications". *American journal of clinical nutrition*, 74: 418-425.
- [5] Ghedira K. **2005.** "Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique". *Phytothérapie*.3 (4):162-169.
- [6] Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S. **2002.** "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway". *Journal of experimental botany*, 53 (377): 209 -210.
- [7] Lahouel M. **2005.** "Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- [8] Justen U., Knuthsen P., Leth, T. **1998** "Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection". *Journal of Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 432-438.
- [9] Bronner W.E., Beecher G.R. **1995** "Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates". *Journal of Chromatography A.* 705: 247-256.
- [10]Hollman P.C.H., Katan B. **1999** "Dietary flavonoids: Intake health effects and bioavailability". *Food Chem. Toxicol.* 37: 937-942.
- [11] Crozier A. **1997.** "Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J.Chromatography A.* 761: 315-321.
- [12] Besle J. M., Lamaison J. L., Pradel P., Fraisse D., Viala D. et Martin B. **2004.** "Les flavonoïdes des fourrages au lait". *Rencontres Recherches Ruminants.*, 11 : 67-70.
- [13] Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P. **1998.** "Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy". *Journal of experimental botany*, 49 (323): 953-965.
- [14] Boudet A. M. **2000.** "L'usine chimique". 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16.
- [15] Erlund I. **2004.** "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin: Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology" *Nutrition Research.* 24: 851–874.
- [16] Schieber A., Keller P. **2001.** "Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates". *J. of Chromatography A.* **910**: 265-273.

- [17] Bruneton J. **1999** "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec. & Doc. Lavoisier, p 1120.
- [18] Berregioua A. **2006**. "Etude theorique ders conformations preferentielles des flavonoides naturels". Memoire de magister soutenu à l'université de Bechar
- [19] Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. **2007**. "Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data". *Journal of brazilian chemical society*, 18 (5): 891-899.
- [20] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. **2001**. "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential". *Indian journal of pharmacology*, 33: 2-16.
- [21] Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. **2005**. "Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique". Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- [22] Belkacem S. **2009**. "Investigation phytochimique de la phase n-butanol de l'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* (Compositae)". These en chimie organique université Mentouri – Constantine Algérie
- [23] Porter L. J. **1980**. " Polymeric proanthocyanidins stereochemistry, structural units, and molecular weight". *J. Chem. Soc .I.2278-2286*
- [24] Czochanska Z., Foo Y., Newman R. H., Porter L. J. **1980**. "Polymeric Proanthocyanidins Stereochemistry, Structural Units, and Molecular Weight". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2278-2286.
- [25] IUPAC, **1979**, *Edition of Nomenclature of Organic Chemistry*).
- [26] Winkel-Shirley B. **2001**. "Flavonoid biosynthesis. A chlorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology". *Plant Physiology.*, 126 : 485-493.
- [27] Remesy **1996** : Cité par Milane Hadi. **2004**. "La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques". Thèse de doctorat en Sciences. Université Louis Pasteur Strasbourg.
- [28] Chaouche M **2010** "Recherche et Détermination Structurale des Composés Flavoniques de L'espèce : *Myrtus communis* L. (Myrtaceae)" Thèse en chimie organique universite mentouri- constantine, Algérie.
- [29] Harborne J. B. **1973**. "Flavonoids in phytochemistry", Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Editonal Publishing, p.344.
- [30] Heller W. et Forkmann G. **1988**, In the flavonoids advances in research since 1980. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, p. 399-425.
- [31] Linuma M. et Mizuno M. **1989**. "Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones". *Phytochemistry*, 28, 681-94
- [32] Halbrock K., Grisebach H. **1975**. "Biosynthesis of flavonoids in the flavonoids", edition: Harborne, Mabry, chapman et Hall, London, p. 866.
- [33] Amic D., Davidovic-Amic D., Bešlo D. et Trinajstić N. **2003**. "Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids". *Croatica Chemica*, 76: 55-61.

- [34] Tiqwari A. K. **2001**. "Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy". *Current science*, 81 (9): 1179-1181.
- [35] Yadava R.N., Tiwari L. **2005**. "A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma*. O. Kuntze". *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **7** (2): 185-188.
- [36] Essawi T. et Srour M. **2000**. "Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity". *J.Ethnopharm.* **70** : 343-349.
- [37] Hamilton-Miller J. M. T., Shah S. **2000**. "Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *J. Antimicrob. Chemother.* **46** : 852-853.
- [38] Bouhadjera K. **2005**. "Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L." These de doctorat, université de Tlemcen
- [39] Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. **2004**. "Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside". *Indian. J. Pharmacol.* **36** : 244-250.
- [40] Okigbo RN., Mbajinka CS., Njoku CO. **2005**. "antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopi aethiopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man.
- [41] Ulanowska K. **2006**. "Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains". *Arch. Microbial.* **184** (5): 271-8.
- [42] Ohemeng K. A., Schwender C. F., Fu K. P., Barrett J. F. **1993**. "DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**(2): 225-30.
- [43] Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M. **1995**. "Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics". *Phytother. Res.* **9**(7): 509-12.
- [44] Orturno A., Baidez A., Gomey P., Arenas MC. **2005**. "*Citrus perasidi* and *Citrus sinensis* flavonoïds : Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*"
- [45] Guanon D., Nitriema JB., Sourabié S., Traoré LK., I, Guisson I.P., Kondogbo B. **2003**. "Etude in vitro de l'activité antifongique d'extraits des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* (Mart.) Arecaceae".
- [46] Batawita K., Kokon K., Akpagona K., Koumaglo K., Bouchet P. **2002**. "Activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togalaise : *Conyza aegyptiiae* L. Ait. Var. *lineariloba* (DC) O. Hoffum (Asteraceae)". Cité par Akroum S (2006), *mémoire de magister*, université de Constantine
- [47] Pincemail J., Meurisse M., Imet R. L. et Defraigne J. O. **1999**. "Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer". *Medi-Sphere.* **97**:29-33.
- [48] Hertog M. G. **1996**. "Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids". *Proceeding of the nutrition society*, **55** (1B): 385-397.
- [49] Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V. **2005**. "Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity". *Journal of biological chemistry*, **280** (7): 5636-5645.
- [50] Depeint F., Gee J. M., Williamson G. et Johnson I. T. **2002**. "Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities". *Proceeding of the Nutrition Society*, **61**: 97-103.

- [51] Caltagirone S., Rossi C., Poggi A., Ranelletti F.O., Natali P. G., Brunetti M, Aiello F.B and Piantelli M. **2000**. "Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential" *International Journal of Cancer*. 87 (4) 595–600.
- [52] Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. et Zhang L. **2003**. "Flavonoids: Promising anticancer agents". *Medicinal research reviews*, 23 (4): 519-539.
- [53] González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. **2007**. "Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids". *Nutrición hospitalaria*, 22 (3): 287-293.
- [54] Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S. **2004**. "Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms". *Journal of Pharmacological Sciences*, 96 (3): 229-245.
- [55] Middleton, E. J., **1996**. "Biological properties of plant flavonoids: an overview". *Int. J. Pharmacol.* 34 (5): 344-348.
- [56] Vrijssen R., Van Hoof L. M., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. A., Boeye A., **1987**. "The poliovirus induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3- methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis". *Antivir. Res.* 7(1): 35-42.
- [57] Mucsi I., Pragai B. M., **1985**. "Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids". *Experientia* 41(7) :930-1.
- [58] Spedding G., Ratty A., Middleton E. J., **1989**. "Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids". *Antivir. Res.* 12(2) : 99-110.
- [59] Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A. J., **1993**. "Inhibition of HIV infection by flavanoids". *Antivir. Res.* 46(7): 1257-71.
- [60] Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N. A. **2004**. "Natural flavonoid as antimicrobial agents". *Journal of the American Nutraceutical Association.*, 7 (2): 24-26.
- [61] Marfek A. **2003**. "Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides". Thèse de doctorat de l'université de Limoges.
- [62] Lin J. K. et Weng M. S. **2006**. "The science of flavonoïdes : Flavonoïdes as nutraceuticals". Ed Springer. p 213.
- [63] Hollman P. C. H. **2001**. "Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects". *Journal of the science of food and agriculture*, 81: 825-842.
- [64] Bietrix J. **2004**. "Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval". Thèse de docteur vétérinaire de l'université Claude-Bernard de Lyon. p51.
- [65] Teissedre P. L., Vizzini M. I., Di Mago D., La Neve I., Giammanco S., La Guardia M. et Ginmanco M. **2007**. "Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques". 8th international enology symposium. June 25, 26 and 27. Bordeaux
- [66] Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., Varma S.D. **1983** "Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin". *Biochem Pharmacol.* 32:1995-1998.
- [67] Nève J. **2002**. "Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants". *Nutrition clinique et métabolisme.* 16: 292–300.
- [68] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. et Capasso F. **1999**. "Flavonoids: Old and new aspects of class of natural therapeutic drugs". *Life Sci.*, 65(4): 337-353.

- [69] Ong K.C., Khoo H.E. **2000** "Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats". *Life Sci.* 67: 1695-1705.
- [70] Lien E., Bui H. **1999**. "Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic anti oxidants". *Free Rad Biol Med.* 26:285-294.
- [71] Rice-Evans, C.; Miller, N. **1997**. "Anti-oxidant properties of phenolic compounds". *Trends Plant Sci* 2:152-159.
- [72] Park H. J. et Cha H. C. **2003**. "Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho". *Korean journal of biological society*, 7: 327-330.
- [73] "flavonoïdes"(Mai **2010**). <http://www.biam2.org/www/cla-49523.html>
- [74] Loisseur J., **1973**. "Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique", Tome 1, Editeurs Masson et CIE
- [75] Marston A., and Hostettmann K. **2006**. "Separation and quantification of flavonoids, in Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications", (Anderson, O. M. and Markham, K. R., eds.), CRC, Boca Raton, FL, pp. 1-36.
- [76] Darwish-Sayed M., Balbaa S. I. and Afifi M. S. **1974**. "The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*". *Planta Medica*, 26, 293-298.
- [77] Houghton P. J., Raman A. **1998**. "Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts". 1^{ère} éd; Londres, pp:29-31
- [78] Hadi M. **2004**. "La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques". These de doctorat. Université Louis Pasteur.
- [79] Thomas M. **2011** "Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)". Thèse de doctorat. Université d'Orléans
- [80] Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N. et Pohl C. **1996** "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation". *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- [81] Ong E.S., Cheong, J.S.H. et Goh D. **2006** "Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials". *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92-102
- [82] Kronholm J., Hartonen K. et Riekkola M.-L. **2007**. "Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396-412.
- [83] Teo C.C., Tan S.N., Yong J.W.H., Hew C.S. et Ong, E.S. **2010**. "Pressurized Hot Water Extraction (PHWE)". *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
- [84] Reverchon E, De Marco I. **2006**. "Supercritical fluid extraction and fractionation of natural Matter". *J. of Supercritical Fluids*, 38 : 146-166.
- [85] Sutour S. **2010**. "étude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats" these de doctorat. Université de corse.
- [86] Keville K. et Green M. **1995**. "Aromatherapy: A complete guide to healing art", Ed 1: *the crossing press*; p: 120-140.

- [87] Lagunez rivera L. **2006** . "Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe" .Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse ; p: 31-42.
- [88] Ganzler K., Salgo A., Valko K. **1986**. "A novel sample preparation method for chromatography", *J. Chromatogr. A*, 371 : 299-306
- [89] Paré J., Sigouin M., Lapointe J. **1990**. "Extraction de produits naturels assistée par microondes". *Brevet européen*, EP 398798.
- [90] Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini J.F. et Costa J. **2007**. "Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106,132-139.
- [91] Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. **2007**. "Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil". *J. Food Engineer.* 79,1079- 1086.
- [92] Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. **2004**. "Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation". *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- [93] Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F. **2006**. "Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach". *Anal. Chim. Acta.* 555,157-160.
- [94] Flamini G., Tebano M., Cioni P.L, Ceccarini L. Ricci A.S., Longo I. **2007**. "Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven". *J. Chromato. A* 1143, 36-40.
- [95] Lide D.R. **1996**. "Handbook of chemistry and physics", CRC Press, Boca Raton(Ela.)76^e éd.
- [96] Belboukhari N., Cheriti A. **2006**. "Phytochemical Investigation of the Bioactive Extract from *Launaea arbrescens*". *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 9 (15): 2930-2932.
- [97] Cheriti A., Sekkoum K. **1996**. "Flavonoids from *Hermania Mouritanica* growing in Algeria" *ind. J. pharma. Science* 58(5): 203-204.
- [98] Cheriti A., Saad A., Belboukhari N. et Ghezali S. **2006**; "Chemical composition of the essential oil of *Launaea arborescens* from agerian Sahara". *Chemistry of Natural Compunds.* 42 (3):360-361
- [99] Saad A., Cheriti A., Belboukhari N. et Ghezali S. **2005** "Réactions « in situ » dans le procédés d'extraction des huiles essentielles" *Annales de l'Université de Bechar* N° 1, 9-14
- [100] Benguerba A. **2008** "etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece *inula crithmoides* L". Thèse en chimie organique, universite Mentouri constantine, Algérie.
- [101] Markham K. R. **1989**. "Flavone, flavonols, and their glycosides, Methods in plant biochemistry" Academic press. p. 197-232.
- [102] Mabry T.J., Markham K.R. et Thomas, M.B. **1970**. "The systematic identification of flavonoids". Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254.
- [103] McLafferty F. W. Michnowicz J. A. **1992**. "State-of-the-art GC-MS". *Chemtech.*, 22, 182-189.
- [104] Markham K. R. **1982**. "Technique of flavonoids identification", Academic press, London

- [105] Martini N.D., **2001**. " The isolation and characterisation of antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Burch.) de doctoral thesis, university of Pretoria (South Africa).
- [106] Martin A.J.P., Synge R.L.M. **1941**. "A new form of chromatogram employing two liquide phases.1. A theory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins". - *Biochemistry Journal*, 35, 1358-1368.
- [107] Harborne J.B. **1966**. "Comparative Phytochemistry" (Goodwig, T.W.ed), Academic press London.
- [108] a-Jurd L. et Horwitz R. **1962**. "Spectral propreties of flavonoids compounds", pergmon press, Oxford, 107-155
b-Jurd L. **1969**. "Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations". *Phytochemistry* 8 (2) : 445-462.
- [109] Trouillas P., Allais D.P., Calliste C.A., Lotfi H. et Du Roux J. L. **2003** "Structure activity relationships of flavonoids as 1-hydroxymethyl radical and 1-hydroxyethyl radical scavengers. A γ -radiolysis study combined with molecular modeling". *Radiat. Res.*; 51: 1270-1277.
- [110] Bacon J.D. and Mabry T. A. **1976**. "UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols". *Rev. Latinoamer, Quim*, 7, 83-86.
- [111] Silverstein R.M., Basler G. C. and Morill T.C. **1998**. "Identification spectrométrique de composés organiques". De Boeck université, Paris, Bruxelles.
- [112] Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H. et Claeys, M. **1997**. "Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.
- [113] Hvattum E. et Ekeberg D. **2003**. "Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43-49.
- [114] Cuyckens F. and Claeys M. **2004**. "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids". *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- [115] Harkati B. **2011**. "Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *scorzonera undulata*". Thèse de doctorat, université mentouri-constantine, Algérie.
- [116] Grosu I., Mager S., Darabantu M. **1999** "Résonance Magnétique Nucléaire appliquée à l'analyse des composés organiques" , publication de l'université de Rouen.
- [117] Markham K. R., et Geiger H. **1993**. " ¹HNMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides, in hexadeuterodimethylsulfoxide. In the flavonoids, 1994, edited by Harborne, J. B. Chapman and Hall, London.
- [118] Markham K.R. , Mabry T.J. Harborne J.B. et Mabry H . **1975**. "the flavonoids" , editions Chapman and Hall, London, p. 45.
- [119] Bilia A. R., Ciampi L., Mendez J., Morelli I. **1996**. "Phytochemical investigations of *Licaniagenus*. Flavonoids from *Licania pyrifolia*". *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 71(3) :199- 204.
- [120] Pawan K. **1992**. "NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides", *Phytochemistry*, 31, 3307-3330.

- [121] Günther H. **1994**. "La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie". Masson, Paris.
- [122] Williamson M., Neuhaus D. **1989**. "The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis", VCH, New York.
- [123] Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J. **1995**. "Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy". *J. Magn. Reson. Anal.* 1 :25-34.
- [124] Verpoorte R., Choi Y.H., Kim H.K. **2010**. "Metabolomics: will it stay?". *Phytochem. Anal.* 21 : 2-3.
- [125] De Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C. et Brinkman U.A.T. **2006**. "Analytical separation and detection methods for flavonoids". *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- [126] Hostettmann K. et Wolfende, J.-L. **2001**. "Application of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolite". *Journal of Chromatography* 31-68.
- [127] Cuyckens F. et Claeys M. **2004**. "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids". *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- [128] Stobiecki M. **2000**. "Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides". *Phytochemistry*, 54(3), 237-256.
- [129] De Hoffmann E. et Stroobant V. **2005**. "Les sources d'ions". In *Spectrométrie de masse*, 3^{ème} éd. Paris, pp. 14-75.
- [130] Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E. et Quetin-Leclerc J. **2001** "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
- [131] Mroczek T., Ndjoko K., Glowniak K., Hostettmann K. **2004**. "On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 1056 : 91-97.
- [132] Dugo P., Mondello L., Dugo L., Stancanelli R., Dugo G. **2000**. "LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 : 147-154.
- [133] Andrade D.P., Santos C., Datchler M., Albert K., Vilegas W. **2002**. "Use of on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*". *J. Chromatogr. A*, 953 : 287-291.
- [134] Novak P., Tepes P., Fistic I., Bratos I., Gabelica V. **2006**. "The application of LC-NMR and LCMS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 : 1268-1272.
- [135] Mondello L., Lewis A.C., Bartle K.D, Marriott P.J. **2002**. "Multidimensional Chromatography". Chichester, England. Chapter 3 and 4, pp47-108.
- [136] Deslauries I. **2000**. "Composés phénoliques et flavonoïdes des produits d'érable". *Food science*, Université McGill, Montréal (Canada).
- [137] Sasaki T.A., Wilkins C.L. **1999**. "Gas chromatography with fourier transform infrared and mass spectral detection". *J. Chromatogr. A*, 842 : 341-349.
- [138] Thomaidis N.S., Georgiou C.A. **1999**. "Edible oil analysis by flow injection". *Lab. Autom. Inf. Manag.* 34 : 101-114.

- [139] Coleman W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M. **1989**. "Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds". *Appl. Spectrosc.* 43 : 298-304.
- [140] Adams RP. **2001**. "Identification of essential oils components by gas chromatography quadrupole-Mass Spectroscopy". Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- [141] Senatore F., Arnold N.A., Piozzi F. **2004**. "Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon". *J Chromatogr A.* 1052 : 237-240.
- [142] Marston A. **2007**. "Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry". *Phytochemistry*, 68(22-24) :2786-2798.

CHAPITRE III

*INVESTIGATION BOTANIQUE ET
ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE
Moricandia arvensis ET Zilla macroptera*

1. Aperçu botanique et ethnopharmacologique des Brassicaceae [1]

1.1. Introduction : Les Brassicaceae appelées autrefois 'crucifères' constituent une importante famille de plantes représentées dans le monde entier. La plupart de ses espèces préfèrent les climats frais. Elles se trouvent surtout dans les régions froides principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [2]. Leur proportion dans la flore phanérogamique diminue lorsqu'on s'éloigne des régions polaires. Ce sont principalement des plantes variables; annuelles, bisannuelles ou vivaces [3].

La famille Brassicaceae est une famille très importante autant par le nombre d'espèces qu'elle regroupe que par l'importance économique de plusieurs de ses espèces [4].

1.2. Caractéristiques générales : Les Brassicaceae est une famille de plantes dicotylédones, généralement herbacées à racine pivotante, dont les tiges portent des feuilles sans stipules, alternes ou toutes à la base, très rarement sous-arbrisseaux ou arbustes, rarement ligneuses, parfois succulentes ou épineuses. Cette famille évoluée présente une grande homogénéité dans le type de fleur et le modèle de fruit [2, 3]. Le périgone comporte des pièces non soudées : quatre sépales et, en alternance, quatre pétales (corolle dialypétale). Le nombre et la disposition des sépales et les pétales sont tellement constants et remarquables que l'on a donné le nom de crucifères - ou porte-croix - à la famille, au lieu de l'appeler du nom d'un genre important. Le fruit comporte deux loges séparées par une cloison médiane qui porte les graines: c'est une silique [2, 3]. Les grappes florales, de type indéfini, n'ont pas de bractée. Elles sont souvent odorantes et généralement de couleur vive, attirent les insectes.

L'existence d'un appareil nectarifère renforce ce caractère d'entomophilie. Exceptionnellement, en l'absence d'insectes, il peut y avoir autofécondation; celle-ci devient la règle pour de petites plantes bordant les lacs (comme les *Subularia*), où la fécondation peut s'effectuer même si la fleur reste submergée [2, 3].

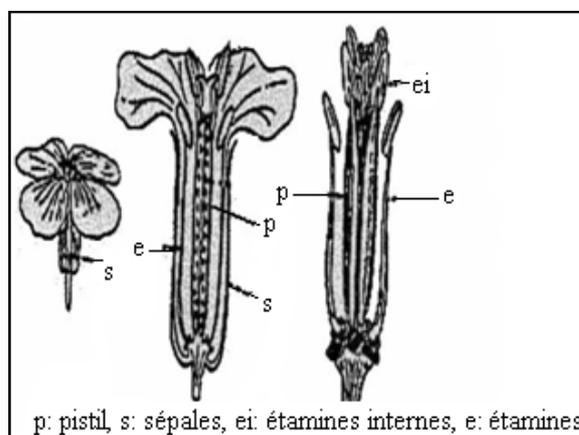


Fig.3.1 Morphologie des Brassicaceae [2]

1.3. Position systématique des Brassicaceae [5]Régne : plante (*plantae*)Sous-régne : plantes vasculaires (*Tracheobionta*)Division : plantes à graines (*Spermaphyta*)Classe : plantes à fleurs (*Angiospermae*)Sous classe : dicotylédones (*Dicotyledonae* ou *Magnoliopsidae*)Super-ordre : dillénidés (*Dilleniidae*)Ordre : capparales (*Capparales*)

Famille: Brassicaceae

Tab.3.1 : Classification évolutive des Brassicaceae [6-8].

	Engler	Takhtajan	Cronquist	Thorne	APG II
Super-classe					Tricolpées (Eudicots)
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Tricolpées évoluées
Sous-classe	Archichlamydeae	Dilleniidae	Dilleniidae	Magnoliidae	Rosidae
Super-ordre		Violanae		Violanae	Eurosidées II
Ordre	Papaverales	Capparales	Capparales	Brassicales	Brassicales
Sous-ordre	Capparineae				
Famille	Cruciferae	Brassicaceae	Brassicaceae	Brassicaceae	Brassicaceae

1.4. Principaux genres : Les Brassicaceae peuplent la presque totalité des habitats et des milieux de vie possibles: sables et rochers maritimes, bords de ruisseaux, talus calcaires, pelouses humides ou sèches, cultures et jardins, bords de chemins, cailloutis , prairies de montagne, ... Elle comprend 350 genres et 3200 espèces [9] dont 200 en Algérie [10].

Tab.3.2 : Exemples de quelques genres des Brassicaceae

	genres	exemple
Légumes	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ou Arabette des Dames
	<i>A Armoracia</i>	Genre de raifort
	<i>Brassica</i>	Les choux, la moutarde, les navets
	<i>Raphanus</i>	Les radis
Plantes oléagineuses	<i>Brassica</i>	<i>Brassica napus</i> ou colza
	<i>Camelina</i>	<i>Camelina sativa</i> ou cameline
Plantes ornementales	<i>Aubrieta</i>	<i>Aubrieta deltoidea</i>
	<i>Alyssum</i>	<i>Alyssum maritimum</i>
	<i>Iberis</i>	<i>Iberis sempervirens</i>
Quelques genres sauvages	<i>Alliaria</i>	l'alliaire
	<i>Capsella</i>	Capselle boursse à pasteur
	<i>Cochlearia</i>	Cochléaire officinale

1.5. Usages des Brassicaceae: La famille des Brassicaceae, est parmi les dix familles des plantes les plus économiquement importantes [4,11]. En effet, de nombreuses espèces sont utilisées comme plantes alimentaires.

Certaines Brassicaceae sont utilisées comme condiments telles que : la moutarde noire (*Brassica nigra*), la moutarde chinoise (*B. juncea*), la moutarde blanche (*Sinapis alba*), le raifort (*A Armoracia rusticana*), la diplotaxe (*Diplotaxis harra*), le wasabi, (*Eutrema wasabi*) condiment japonais ressemblant au Raifort [11]. D'autres sont employées comme sources industrielles des huiles végétales (oléagineuses) : *Brassica oleracea* L. La graine contient de 45 à 50 % d'huile. Des variétés sont pauvres en acide érucique et en glucosinolate sont commercialisées pour l'usage alimentaire sous le nom d'huile canola (abréviation de Canadian oil low acid) [11].

La famille comporte beaucoup de plantes ornementales, en particulier : les alyssons ou alyssums (*Alyssum* ou *Lobularia*), les girofles (*Erysimum*) et l'isatis des teinturiers (*Isatis tinctoria*) qui donne une teinture bleue qui a été remplacée progressivement par l'indigo puis par des produits de synthèse. D'autres espèces sont employées comme matériel expérimental pour l'étude du génome : *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.. Cette espèce a été choisie par la communauté scientifique comme un modèle de plante pour les études des gènes et de leur expression. La séquence de l'ADN des chromosomes de cette espèce est connue depuis les années 2000 [12]. Selon Bellakhdar [13], les Brassicaceae sont très utilisées en médecine traditionnelle marocaine. Les feuilles de chou (*Brassica oleracea*) sont utilisées en cataplasme contre toutes les maladies des reins. D'autres espèces comme *B. napus*, *B. nigra*, *Erica vesicaria* sont utilisées par voie interne comme réchauffants. *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* entrent dans le traitement de la stérilité.

Au sud algérien, on indique *Oudneya africana* (Nom local : Alga) pour traiter les maladies de la peau en usage externe, sous forme de pâte, mélangée avec *Lawsonia inermis* (Henné) [14]; au Maroc, elle est utilisée dans le traitement des maladies de l'intestin [13].

En médecine traditionnelle chinoise, ils utilisent l'*Erysimum cheranthoides* pour soulager les fièvres et pour traiter les maladies cardiaques [15]. Ils suggèrent de consommer le maca (*Lepidium mejenii*) en tant que fortifiant, tonique et énergisant.

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'une consommation fréquente de Brassicaceae (plus de 30 fois par mois) diminuait le risque de plusieurs maladies chroniques [16,17], cardiovasculaires [18,19], de certains cancers tels que celui du poumon, des ovaires et des reins [20,21]. Une étude concernant l'aspect botanique des plantes sahariennes, quelques Brassicaceae, telles que *Savignya longistyla* (Gouglene), *Moretia canescens* (Habalia), *Erysimum officinalis*

(Harfi), *Diplotaxis acris* (Harra), *Farestra ramosissima* (Lehma) et *Zilla spinosa* (Chobrog), ont été citées parmi les pâturages des dromadaires en Algérie[22].

2. Monographie de la plante *Moricandia arvensis*

2.1. Le genre *Moricandia* : Ce genre est originaire d'Asie occidentale, d'Afrique du nord et d'Europe méridionale. Il s'agit de plantes herbacées annuelles ou vivaces fréquemment glabres, aux feuilles basales et caulinaires alternes, sessiles, simples et généralement entières, souvent subamplexicaules. Les fleurs, actinomorphes et bisexuées, sont groupées en racème terminal lâche. Elles se composent de 4 sépales libres, de 4 pétales libres, de 6 étamines libres formant un androcée tétradynome et d'un ovaire supère et uniloculaire. Les fruits sont des siliques linéaires [2, 3]. Le genre *Moricandia* contient cinq espèces : *M. arvensis*, *M. foetida*, *M. foleyi*, *M. longirostris* et *M. sinaica* [12].

2.2. L'espèce *Moricandia arvensis* L. (syn: *M. suffruticosa*)

2.2.1. Nomenclature botanique

Nom anglais: Purple mistress

Nom français: Moricande des champs

Nom tamahaq : Tamadjhé

Nom vernaculaire: krom ejmel, Gdem [10], Rbiaât ejmel(Maroc)[23]

2.2.2. Systématique et caractères morphologiques

-Systématique

Règne : végétal

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Magnolopsides ou Dicotylédones

Sous classe : Dillenidés

Ordre : Capparales

Famille : Brassicaceae

Genre: *Moricandia*

Espèce: *arvensis*

-Caractères morphologiques: Plante annuelle ou vivace (haut : 65 cm), rameuse. Feuilles obovales, à la base cunéiforme à amplexicaule, aux marges entières à crénelées, à l'apex aigu à obtus.

Fleurs aux sépales linéaires ou longs, aux pétales obovaires, blancs à pourpres (long : 21-29 mm), groupées par 10-20 en racème terminal lâche. Siliques linéaires (long: 30-60 mm, diam : 2-3 mm). La floraison s'effectue pendant l'hiver et le printemps [2]. *M. arvensis* ressemble beaucoup à *Schouwia thebaica*, pour les différencier il faut regarder les siliques : longues pour *M. arvensis*, arrondies et aplaties pour *S. thebaica*[10].

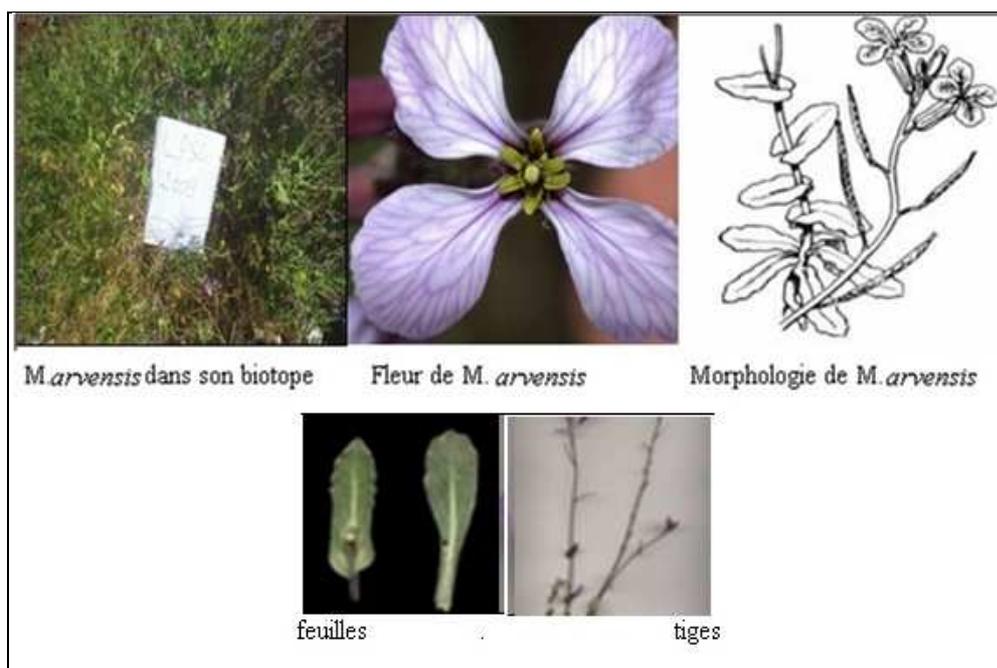


Fig. 3.2 : *M.arvensis* [2,24]

2.2.3 Distribution / Habitat: *M.arvensis* se trouve en Europe méridionale (de l'est de l'Espagne jusqu'en Grèce) et en Afrique subtropicale (Algérie, Maroc, Tunisie et Libye). En Algérie elle se trouve dans le Mezab, Ouargla, Biskra et dans le Sud ouest. Elle se trouve sur les rochers et dans les montagnes du Sahara central comme dans tout le Sahara septentrional [22].

2.2.4. Constitution chimique: Une étude faite sur les racines a décrit l'isolement de trois glucosinolates (Hydroxy-3-butenyl, 3-indolylmethyl et 1-méthoxy-3-indolylmethyl) [25]. Dans deux études [26, 27] a été démontré qu'à partir des fleurs de *Moricandia arvensis* ont été isolés des acides phénoliques et des hydrocarbonates.

2.2.5. Données pharmacologiques: L'activité antibactérienne des extraits, préparés à partir des feuilles sèches de *Moricandia arvensis*, a été évaluée vis-à-vis de différentes souches bactériennes de références. Les extraits les plus actifs vis-à-vis de la plupart des bactéries testées sont l'extrait à l'hexane et celui à l'acétate d'éthyle. La concentration minimale bactéricide (CMB)

la plus importante est celle révélée par l'extrait enrichi en oligomères flavonoïques totaux (OFT) [28,29].

3. Monographie de la plante *Zilla macroptera* Coss.

3.1. Le genre *Zilla* : Ce genre est originaire d'Afrique du nord et d'Asie occidentale. Il s'agit de sous-arbrisseaux, aux rameaux épineux, aux feuilles alternes, simples et entières, rapidement caduques. Les fleurs, actinomorphes et bisexuées, sont groupées en racèmes terminaux courts et pauciflores. Elles se composent de 4 sépales libres, de 4 pétales libres, de 6 étamines libres, formant un androcée tétradynome et d'un ovaire supère et uniloculaire. Les fruits sont des silicules globuleuses aux marges ailées [2,3].

Le genre *Zilla* contient deux espèces : *Z. macroptera* et *Z. spinosa* (nom vernaculaire: *chobrog*)

3.2. L'espèce *Zilla macroptera* Coss.

3.2.1. Nomenclature botanique

Nom français : pois chiche sauvage

Nom tamahaq : Aftazzan

Nom vernaculaire: Boukhla (Algérie), Rbiâat lahnach/Oulharcha (Maroc) [23].

3.2.2 Systématique et Caractères morphologiques

-Systématique:

Règne: Végétal

Embranchement: Magnoliophytes

Classe: Magnoliopsides

Sous classe: Dillenidés

Ordre: Capparales

Famille: Brassicaceae

Genre: *Zilla*

Espèce: *Macroptera*

-Caractères morphologiques: Plante glabre, épineuse, vert bleuté, formant une boule très dense, taille: 20 à 60 cm. Feuilles sessiles, charnues, en spatule, présentent sur les jeunes rameaux. Fleurs violettes, pratiquement sans pétiole. Le fruit est une silicule à quatre ailes [2,3].



Fig.3.3: *Z. macroptera* (dans son biotope (Mars 2009) [24] et sa morphologie [2])

3.2.3 Distribution / Habitat : *Z. macroptera* est une espèce endémique du Sahara algérien: Ghardaia, El Golea et du Sud ouest jusqu'a Béni Abbés (Bechar) [30].

3.2.4. Données pharmacologiques: L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne et celle de la capacité antioxydante donnent des résultats intéressants. Les fruits de *Z. macroptera* semblent être une source des antioxydants [31, 32].

4. Etude ethnopharmacologique:

L'étude ethnopharmacologique a été réalisée de Février 2009 jusqu'à Avril 2011. L'objectif principal de cette étude est de connaître l'utilisation de *Zilla macroptera* et *Moricandia arvensis* dans la médecine traditionnelle à travers la Wilaya de Béchar. Nous avons aussi lancé une enquête pour essayer d'inventorier certaines plantes médicinales à travers trois autres wilaya du sud ouest algérien (Adrar, El Bayadh et Naama)

4.1. Régions d'étude

Adrar : localisée dans le Sud-ouest du pays. Elle est délimitée au Nord par les wilayas d'El Bayadh et de Ghardaïa, à l'Ouest par les wilayas de Béchar et Tindouf, à l'Est par la wilaya de Tamanrasset et au Sud par la Mauritanie et le Mali. Majoritairement occupée par le Sahara avec un climat aride saharien. Elle est peu peuplée (402 197 habitants), au regard d'une superficie de 427368 km² [33].

-Bechar : Avec une superficie de 161.400 Km², soit 6,77% environ du territoire national, la Wilaya de Bechar occupe le 6^{ème} rang par rapport à l'ensemble des wilayate du pays. Elle est peuplée de 272.436 habitants [33]. La majorité de la population est constituée de quatre origines importantes ; Ouled djerir, Dwimni'a, Ksouriens et Ch'ragua.

Le territoire de la wilaya de Bechar est formé de montagnes, Oueds, Regs(Hamada) et ergs. Elle est caractérisée par un climat de type désertique continental, très chaude en été (+ 45°C) et froid rude en hiver (2°C à 3°C). Les vents de sable sont fréquents et souvent violents (100 km/h) [33].

-El Bayadh : Elle fait partie intégrante de la région des Hauts Plateaux steppiques du Sud-ouest algérien. Elle présente trois grandes zones distinctes : Au nord : les Hautes Plaines ; Au centre : l'atlas saharien ; Au Sud la : Présaharienne. Elle est délimitée au Nord, par les wilayas de Saïda et de Tiaret; à l'Est, par les wilayas de Laghouat et de Ghardaïa ; au Sud-est, par la wilaya d'Adrar ; au Sud-ouest, par la wilaya de Béchar ; à l'Ouest, par la wilaya de Naâma ; au Nord-ouest, par la wilaya de Sidi Bel Abbés. Elle s'étend sur une superficie de 78870 km² pour une population estimée en 2008 à 262 187 habitants [33].

-Naâma : Située entre l'Atlas tellien et l'Atlas saharien, à l'Ouest de l'Algérie, à plus de 1000 mètres d'altitude sur les hauts plateaux. Elle est voisine au Nord avec les wilayas de Tlemcen, Sidi-Bel-Abbès et Saïda, à l'Est celle d'El-Bayadh et au Sud celle de Béchar et à la frontière avec le Maroc à l'Ouest. Le climat est semi-aride. Elle s'étend sur une superficie de 29950 km² pour une population estimée en 2008 à 209 470 habitants [33].

4. 2. Enquete: Nous nous sommes entretenus avec 38 tradipraticiens; les informations sur les utilisations de quelques plantes ont été collectées à l'aide d'un questionnaire semi structuré à travers des conversations avec les guérisseurs en utilisant la langue locale (Arabe). Les guérisseurs ayant accepté de partager avec nous leur savoir ont été invités à donner leur connaissance au sujet des maladies pour lesquelles ils utilisent ces plantes, la méthode de la préparation du médicament ainsi que les détails de son administration, y compris les quantités et le nombre approximatifs de doses par jour ou par semaine, la durée du traitement, les effets secondaires et comment traiter ces effets secondaires. Le questionnaire utilisé pour cette circonstance se trouve en (Figure 3.5). Les utilisations principales de ces plantes ont été déterminées par leur fréquence d'utilisations.

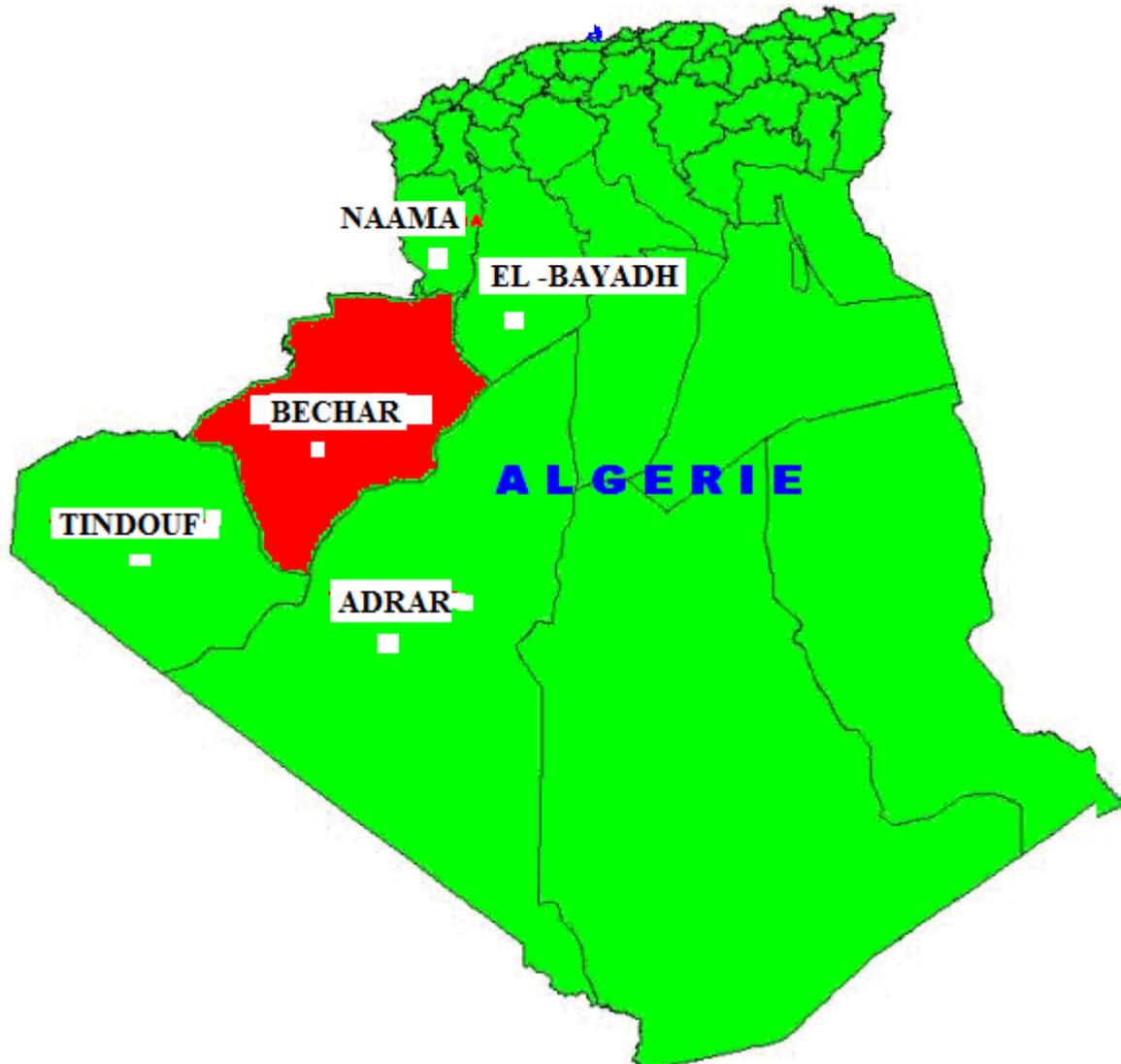


Fig.3.4: Carte d'Algérie
(Position des regions d'étude: Adrar, Bechar, El-Bayadh, Naama) [33].

Tab.3.3: *L'essentiel des plantes inventoriées dans la région d'étude*

Familles	Nombre de plantes
Apiaceae=umbeliferae	12
Asteraceae=compositae	23
Brassicaceae	21
Chenopodaceae	6
Cucurbitaceae	7
Cupressaceae	6
Gramineae	6
Labiatae=Lamiatae	17
Leguminosae	9
Oleaceae	6
Rosaceae	11
Solonaceae	10

Reflétant les traditions des habitants des régions de quatre wilayas de Sud Ouest algérien en matière de traitement des pathologies courantes par les plantes médicinales, notre enquête ethnobotanique révèle que malgré les progrès fulgurants de la médecine moderne, beaucoup de personnes, des deux sexes, privilégient toujours la médecine traditionnelle pour soulager leurs maux, quand le traitement administré par un médecin ne donne pas les résultats escomptés. Ainsi, d'après cette investigation, menée dans les wilayas de Naama, El Bayadh, Bechar et Adrar, 21,50 % des habitants utilisent des plantes médicinales pour traiter leurs désordres gastriques, 22,31 % d'entre eux pour soulager leurs problèmes respiratoires, 13,45% pour traiter les maladies urologiques, 12,5 % en appellent aux vertus thérapeutiques des plantes contre les atteintes dermatologiques, 4 % y ont recours pour contrer les maladies neurologiques, 2,5% vont chez l'herboriste dans l'espoir de soulager leurs problèmes cardiologiques. Cette étude révèle, d'autre part, que parmi les modes d'utilisation les plus courants, les infusions et les décoctions, créditées respectivement de 45% et 30 % de consommateurs, et seulement 1,12% pour les teintures, sirops et distillations. La macération à froid est un mode de préparation pour les plantes dont les substances sont très sensibles à la chaleur.

La plupart des préparations, décoction, infusion macération se prendraient oralement et quelques fois de façon topique. Toutefois certaines préparations telles que sève, pâtes obtenues en malaxant la poudre de la matière végétale sèche avec de l'eau sont employées extérieurement pour le traitement oedémateux, les blessures et d'autres infections de la peau. L'inhalation de vapeur résultant de certaines préparations, le bain avec macéré sont aussi d'autres voies d'administration.

Notre étude a dans l'ensemble indiqué que les parties aériennes des plantes sont les plus employées par les guérisseurs de ces localités (Adrar, Bechar, El Bayadh, Naama).

Généralement on utilise soit la plante entière soit ses organes pris séparément (racines, tiges, feuilles, fleurs...). L'utilisation d'organe est très importante car les différents organes d'une plante peuvent avoir des propriétés différentes, par exemple, pour une même plante, la racine peut être un médicament, la feuille étant un poison, le fruit est un aliment. Donc, il faut dire que tel organe de telle plante a une telle action thérapeutique. Une plante doit être administrée sous une forme galénique appropriée, cette forme est basée sur le fait qu'il doit exister une synergie d'activité pharmacologique entre plusieurs constituants de la plante ou de l'organe considéré [35].

Tab.3.4: Quelques Brassicaceae inventoriées au sud ouest d'Algérie

Nom (Nom vernaculaire)	Propriété-usage	Partie utilisée	Mode de préparation
<i>Alyssum macrocalyx</i> Coss et Dur (Tafssit N-lioughmane)	Vers intestinaux, Diarrhée, Migraine et maux de tête, Fièvre		Décoction cataplasme
<i>Anastatica hierochuntica</i> (Keff meriem/L-kechtam)	Stérilité, Douleur d'accouchement, Froid et rhume, Arthrite rhumatoïde	Feuilles	Décoction poudre
<i>Armoracia rusticana</i> = <i>Cochlearia armoracia</i> (fijl har bari)	Diurétique, stimulant, inflammation d'œsophage, toux	Racines, feuilles, graines	Poudre, cataplasme
<i>Brassica nigra</i> = <i>sinapis nigra</i> (khardel aswad)	Stimulant, vomitif, révulsif, rhumatisme, bronchite, antibactérien	Feuilles, graines	Infusion, cataplasme
<i>Brassica juncea</i> (khardel asmar)	Révulsif, stimulant, antibactérien, vomitif, bronchite, rhumatisme,	Feuilles, graines	Infusion, cataplasme
<i>Brassica oleracea</i> (kromb)	Système respiratoire, asthme, cancer, inflammation et infection bactérienne	La plante	Décoction et cataplasme
<i>Brassica napus</i> (left)	Affections de la vésicule biliaire, douleurs d'estomac, anorexie, toux	Les feuilles	Décoction
<i>Brassica alba</i> = <i>Sinapis alba</i> (khardel abyad)	Stimulant, vomitif, stérilité	Feuilles, graines	Infusion, cataplasme
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (kiss-ra'i, harra bariya)	Anti-hémorragie, dermatoses, hémorroïdes, cystites, douleur d'accouchement, épilepsie	Toute la plante	Sec, infusion, cataplasme
<i>Diplotaxis acris</i> (Harra)	réchauffant	Graines	Poudre + miel+ lait, cataplasme
<i>Eremophyton chevallieri</i>	Réchauffant	Feuilles	Poudre + miel
<i>Eruca sativa</i> (jarjir)	Fortifiant, réchauffant, stimulant,	Feuilles, tiges	Décoction, salades
<i>Eruca vesicaria</i> (L) Tanekfaïte/L-harra Hilalia	Vers Intestinaux Rhumatisme, refroidissement		
<i>Farsefia aegyptiaca</i> Turra, <i>F. hamiltonii</i> Royle, <i>F. ramosissima</i> Hochst (L-âoude labyed/ Tameiout)	Douleurs dentaires, Odontorrhagie, Gingivite Spasmes et coliques, gastrite	Feuilles	Décoction

Tab.3.4: (suite) Quelques Brassicaceae inventoriées au sud ouest d'Algérie

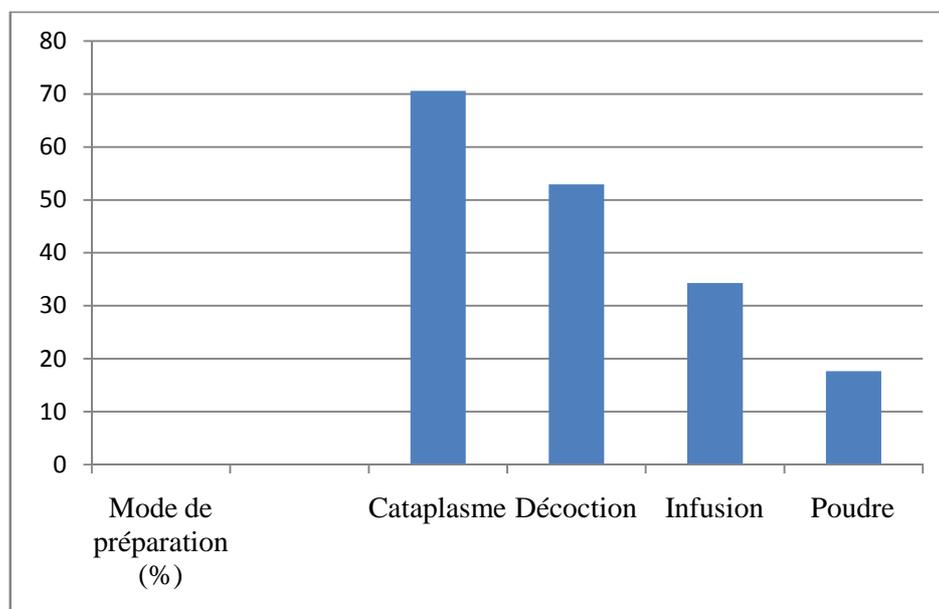
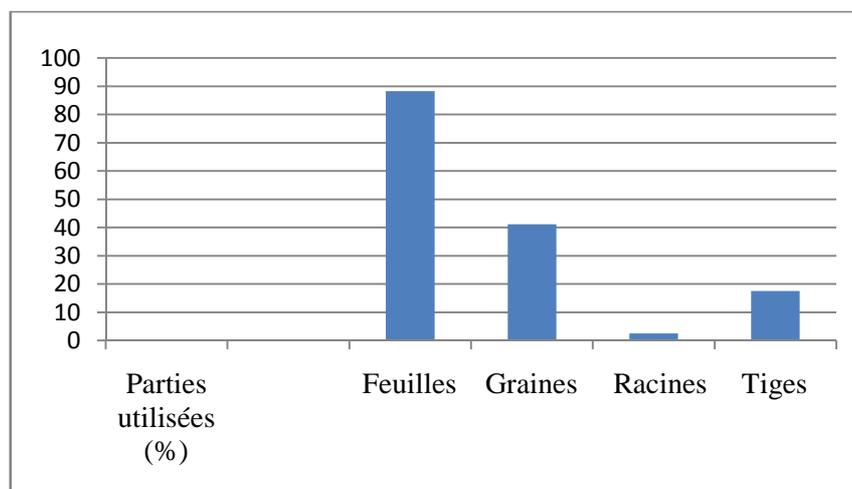
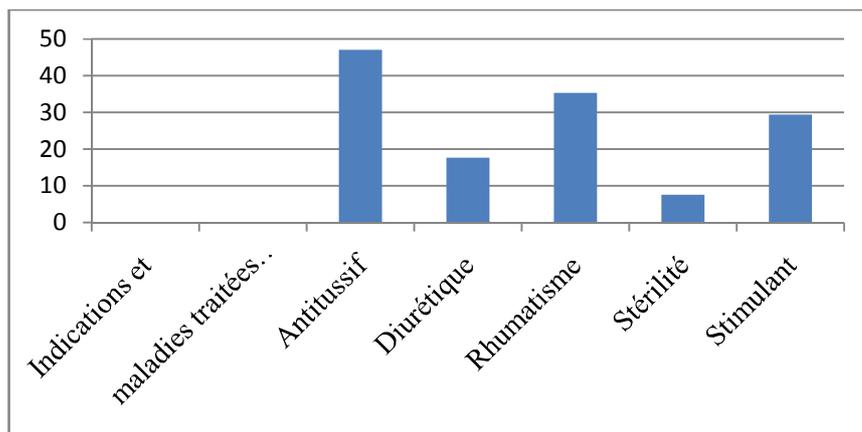
Nom (Nom vernaculaire)	Propriété-usage	Partie utilisée	Mode de préparation
<i>Lepidium sativum</i> (habrched)	Apéritive, tonique, hypoglycémiant, Anti-anémique, diurétique, dermatoses, bronchites, stérilité, affections hépatiques	Feuilles	Cataplasme, décoction, jus
<i>Moreffia canescens</i> (Boiss) Taliouaghte/Hebbalya	Vers Intestinaux Anémie, Anorexie, Froid et rhume	Graines	
<i>Nasturtium officinale</i> (habrched)	contre la calvitie, les taches de rousseur, la gale, les affections pulmonaires, source vitaminique, Dépuratif et antiscorbutique	Feuilles	Cataplasme, décoction, jus
<i>Oudneya africana</i> (alga, hanet libel)	Maladies de la peau, maladies de l'intestin	Feuilles, tiges	Poudre, cataplasme
<i>Pseuderucaria Teretifolia</i>	antalgique et analgésique	Feuilles	Cataplasme
<i>Raphanus sativus</i> (fijl)	Antibiotique, antitussif, nutritif, fortifiant, facilite la digestion	Racines, feuilles, graines	Salade, décoction
<i>Sinapis arvensis</i> (khardel bari)	Stimulant, vomitif, bronchite, rhumatisme	Feuilles, graines	Infusion, cataplasme

Tab.3.5: usage de quelques Brassicaceae inventoriées au sud ouest d'Algérie

Indications et maladies traitées (%)		Parties utilisées (%)		Mode de préparation (%)	
Antitussif	47.05	Feuilles	88.23	Cataplasme	70.58
Diurétique	17.64	Graines	41.17	Décoction	52.94
Rhumatisme	35.29	Racines	2.52	Infusion	34.29
Stérilité	07.60	Tiges	17.50	Poudre	17.64
Stimulant	29.41				

Certains tradithérapeutes ont évoqué quelques effets secondaires tels que vomissement, vertige, tremblement, diarrhée... seraient liés à la prise d'une combinaison de certaines plantes.

En fait, il est difficile de conclure sur l'aspect effets secondaires et toxicologique de ces plantes puisque le concept de dose n'est pas maîtrisé par ces guérisseurs; les effets évoqués pourraient être liés à un surdosage, sachant que les durées de traitement et les doses sont très diverses.



Histogramme 3.1: usage de quelques Brassicaceae inventoriées au sud ouest d'Algérie (Indications, parties utilisées et mode de préparation)

5.2. Usages populaires de *Moricandia arvensis* : Lors de notre enquête ethnopharmacologique, nous avons pu savoir que *M. arvensis* est utilisée essentiellement contre le rhumatisme. D'autres indications ont été citées, tels que le traitement des céphalées et l'utilisation de cette espèce contre les infections, sachant la majorité des tradipraticiens favorisent le cataplasme comme mode d'usage en utilisant les feuilles intactes ou en poudre mélangée avec l'huile [24]. Dans une autre étude, cette espèce a été citée parmi les plantes consommées par le dromadaire et est utilisée pour l'engraissement des animaux dans les zones d'Ouargla et Ghardaïa [22].

Une étude a indiqué que les feuilles et les fleurs sont mélangées avec l'huile d'olive et appliquées localement pour soigner les infections [36].

En Tunisie *M. arvensis* est utilisée contre les céphalées [37]. Elle est utilisée pour traiter la syphilis [37,38]. Cette plante est utilisée aussi contre le scrobut (maladie provoquée par l'avitaminose C) [39]. Les feuilles et les fleurs sont utilisées contre la fièvre [39].

Tab.3.6: Mode-usage de la plante *M.arvensis* [24]

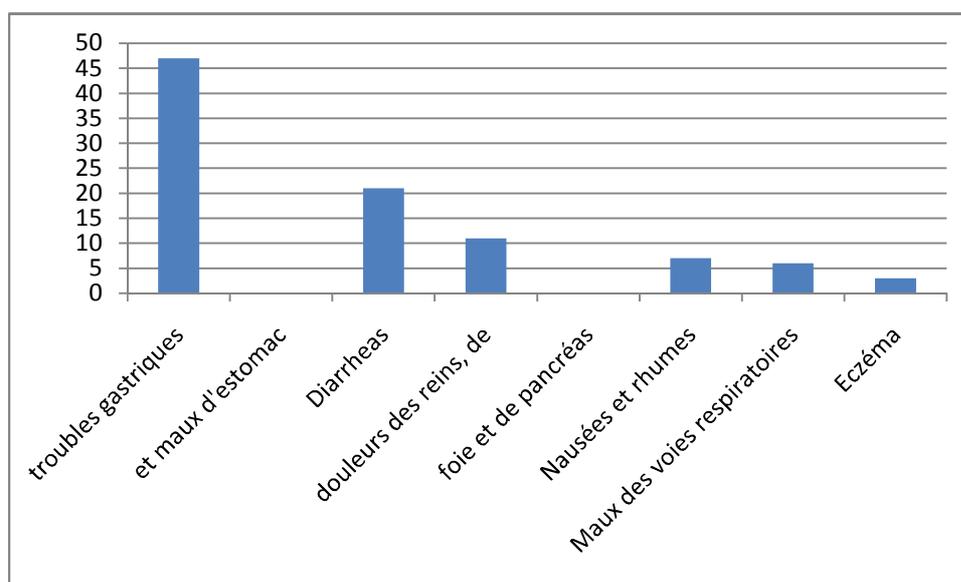
Maladies traitées	Posologie
Céphalées	On lave le front avec la décoction des feuilles dans les cas de nécessité
Fièvre	On prépare une décoction de 50g de matériel végétal dans un litre d'eau, on boit un verre trois fois par jour
Infections	Les feuilles et les fleurs sont mélangées avec l'huile d'olive pendant deux semaines et appliquées localement
Rhumatisme et articulation	Les feuilles et les fleurs sont mélangées avec le henné et l'huile et appliquées localement sous forme de cataplasme
Syphilis	On bout les feuilles et les tiges dans l'eau pendant vingt minutes (20 mn), on filtre et on boit un verre trois fois par jour pendant trois jours
Vers intestinaux	On prépare une décoction de matériel végétal et on boit 1verre deux fois par jour

5.3 Usages populaires de *Zilla macroptera*: Cette espèce est utilisée essentiellement dans le traitement des troubles gastriques [34], contre les maux d'estomac. Elle est utilisée dans le traitement des diarrhées chez les enfants, et comme antifongique pour traiter l'eczéma, elle entre aussi pour calmer les douleurs des reins [13]. C'est la plante de choix pour détoxifier le foie et le pancréas. Elle combat les nausées, active le transit et purifie l'organisme. On peut en faire des cures régulières pendant 2 à 3 semaines. Elle est parfois ajoutée au tabac après avoir été réduit en poudre pour en augmenter la quantité, mais cela n'apporte que des fibres en plus[24].

Dans le temps, pendant la famine, les gens faisaient griller les graines, les pilaient et les rajoutaient à d'autres farines pour en augmenter le volume. Mais cela n'apportait que des fibres et pas d'éléments nourrissants [24].

Tab.3.7 Taux d'usage et maladies traitées par *Z. macroptera* [24]

	Maladies	Taux(%)
1	Troubles gastriques et maux d'estomac	47
2	Diarrhées	21
3	Douleurs des reins, de foie et de pancréas	11
4	Nausées et rhumes	7
5	Maux des voies respiratoires	6
6	Eczéma	3

**Histogramme 3.2** : Taux d'usage et maladies traitées par *Z. macroptera*

En exploitant les réponses des tradithérapeutes, nous avons pu recapituler les posologies (quantités prises par jour) afin de calmer les maux et traiter les maladies.

Tab. 3.8 : Quantités prises par jour (la partie aerienne de *Z. macroptera*) [24]

Maladies traitées	posologie
Diarrhées	Un grand verre une fois par jour après decoction ou macération
Douleurs des reins, de foie et de pancréas	Un grand verre une fois par jour Après decoction
Maux des voies respiratoires	Un grand verre une fois par jour après décoction
Troubles gastriques et maux d'estomac	Un grand verre une fois par jour après macération

Nous devons signaler que *M. arvensis* (krom jmel) est peu connue chez les herboristes. Même chez les tradipraticiens, nous avons trouvé des difficultés concernant l'identification puisque le nom vernaculaire de la plante parait étrange. Nous avons remarqué aussi que les herboristes et

les thérapeutes confondent entre les deux espèces, *Launaea arborescens* (Oum Ibina) et *Zilla macroptera* (Boukhlala).

Lors de notre enquête, nous avons pu connaître les acteurs de la thérapie traditionnelle, qui sont : *El 'attâr* (l'herboriste; le pharmacien; le droguiste-herboriste), *EL jabbar* (le rebouteux, le redresseur), *La qâbla* (la sage-femme), *Le m'rabet* (plur.: *m'rab'tin*), (marabout); le *taleb* (plur.: *tolba*) (le lettré); le *cheïkh* (plur.: *chouyoukh*), (le Vieux, l'Ainé, Un qui sait)...[40]

Tab.3.9: Répartition des tradipraticiens en fonction de l'age et du sexe

Age/an	Nombre
20-45	3
45-60	11
61-85	21
> 85	3
Sexe	Nombre
Masculin	34
Feminin	4

Conclusion

Notre étude ethnobotanique a révélé l'importance de la pratique de la phytothérapie par la population du Sud-ouest algérien. La collecte, la synthèse et la confrontation des données recueillies a permis de contribuer à la transformation du savoir populaire, de l'oralité à l'écrit par l'établissement de la monographie de deux plantes médicinales et leurs usages.

La population du Sud-ouest semble utiliser les plantes pour traiter plusieurs maladies. Le choix du type de préparation et du mode d'administration semble suivre la logique du système galénique. En générale les préparations sont sous forme liquide, solide ou mélange. Le cataplasme est le mode le plus pratiqué.

Ajoutés aux conclusions des autres investigations, faites par notre laboratoire, nous remarquons que les traditions continuent d'influer sur les décisions des citoyens convaincus que ces pratiques transmises, de génération en génération, représentent toujours à leurs yeux la meilleure des médications.

Une valorisation dans les domaines de la pharmacologie et de l'industrie sera un moyen d'assurer le passage de la médecine traditionnelle à la médecine moderne, pour une pharmacopée rénovée. Ceci devrait se faire dans une plus grande efficacité et une diminution de la toxicité et doit viser la valorisation et la promotion de ce patrimoine culturel, qui finalement permettra de contribuer au développement et au bien-être de la population locale.

Éléments des références bibliographiques

- [1] Berreghioua A., Cheriti A., Belboukhari N. & Marouf A. **2009**. "Aperçu ethnopharmacologique et chimique des *Brassicaceae*". Annales de l'Université de Bechar. N°5
- [2] Ozenda P. **1977**. "Flore du sahara", Ed. CNRS, 250-259, Paris, France
- [3] Quezel P. et Santa S. **1963** "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", Tome II, 387-398, Paris France.
- [4] Rafael F., Elena C. **2005**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". *Phytochemistry*, Vol.66 (12), 175-185.
- [5] Cronquist A. **1988**. "The evolution and classification of flowering plants". Columbia University Press, New-York.
- [6] Password F. **2003**. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II". *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 399-436.
- [7] Graham S. W., Olmstead R. G. **2000**. "Evolutionary significance of an unusual chloroplast DNA inversion found in two basal angiosperm lineages". *Current Genetics* 37, 183-188.
- [8] Lee J., Bernasconi-Quadroni F., Soltis D. E., Soltis P. S., Zanis M., Zimmer E. A., Chen Z., Savolainen V., Chase M. W. **1999**. "The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes". *Nature*, 402, 404-407.
- [9] Ongilagha J., Bala A., Hallet R., Gruber M. **2003**. *J. Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1309-1332.
- [10] Maarouf A. **2009** (<http://www.algerianativeplants.net>) consulté le 24/5/2010
- [11] Troyer K., Katherine K. S., Jed W.F. **2001**. "Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, (919) 299-304
- [12] Skandrani I., Ben Sghaier M., Neffati A., Boubaker J., Bouhlel I., Kilan S., Mahmoud A., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. **2007**; *Drug Chem. Toxicol.*, 30(4), 361-382
- [13] Bellakhdar J. **1997**. "La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoir populaire", Ibis presse, 213-224.
- [14] Smadi A. **2006** "étude de l'extrait chloroformique d' *Oudneya africana*" mémoire de magister Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algérie.
- [15] Zhen-Huan L., Shoji Y., Toshihiro N., Tai-Bao S., Jin-Zhe, X. **1998**. *Phytochemistry*, Vol.49 (6), 1801-1803.
- [16] Bazzano L.A., Serdula MK., Liu S. **2003**. "Dietary intake of fruits and vegetables. *Curr. Atheroscler. Rep.* 5(6):492-9.
- [17] Lampe JW. **1999**. "Health effects of vegetables and fruit". *Am J Clin Nutr*; 70:475-90.
- [18] Ganji V., Kafai MR. **2004**. "Frequent consumption of milk, yogurt, cold breakfast cereals and cruciferous vegetables" *Am J Clin Nutr*; 80(6):1500-7.

- [19] Guthikonda S., Haynes W.G. **2006**. "Homocysteine: role and implications in atherosclerosis". *Curr Atheroscler Rep* March;8(2):100-6.
- [20] Brennan P., Hsu C.C., **2005**. "Effect of cruciferous vegetables on lung cancer". *Am J Clin Nutr*; 366(9496):1558-60.
- [21] Pan S.Y., Ugnat A.M. **2004**. "Acase control study of diet and the risk of ovarian cancer" *Cancer pidemiol Biomarkers Prev* September;13(9):1521-7.
- [22] Longuo H. F., Chehma A. et Ouled Belkher A. **1989**. "Quelques aspects botaniques et nutritionnels des paturages du dromadaire en Algerie", *Options mediteranéenes- Serie Seminaire- n°*. 2- 47-53.
- [23] El Rhaffari L., Zaid A. **2002** "Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée" p.293-318, IRD Éditions. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/7244?lang=en>
- [24] Berreghioua A. et Cheriti A. **2011**. Ethnopharmacologie et Screening phytochimique de deux Brassicaceae du Sud Ouest Algérien. *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar, 04 - 05 décembre.
- [25] Belkhiri A. et Lockwood G. B. "An indole derivative and glucosinolates from *Moricandia arvensis*" *Phyrochemistry*, **1990**, Vol. 29, No. 4, pp. 1315-1316.
- [26] Braham H., Mighri Z., Ben Jannet H., Matthew S. Abreu P. M. **2005**. "Antioxidant Phenolic Glycosides from *Moricandia arvensis*". *J. Nat. Prod.*, 68, 517-522.
- [27] Braham H., Mighri Z., Ben Jannet H., Abreu P. M. **2007**. "Carbohydrates from *Moricandia arvensis* growing in Tunisia", *J. Soc. Chim.Tunisie*, 9: 109-113.
- [28] Dals D., Limem I., Ben mansour H., Chibani J., Chekir ghedira L., Ghedira K. **2007**. "Etude des activités antibactériennes et antioxydantes de différents extraits issus des feuilles de *Moricandia arvensis*". *Revue des régions arides*. (1), pp. 262-269
- [29] Skandrani I., Bouhlel I., Limem I., Boubaker J., Bhourri W., Neffati A., Ben Sghaier M, Kilani S., Ghedira K. et Ghedira-Chekir L. **2009**. "*Moricandia arvensis* extracts protect against DNA damage, mutagenesis in bacteria system and scavenge the superoxide anion". *Toxicology in vitro*, 23(1):166-175.
- [30] Ozenda P. **1983**. "Flore du sahara", Ed.CNRS, Paris, France.
- [31] Bouchouka E., Abdelouaheb D., Abdesselem B. **2012**. "Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from algerian sahara". *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 11(1):61-6
- [32]_a Bruneton J. **1993**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". 2^{ème} édition; université de Paris- sud, France, PP. 389-617.
- [32]_b Bruneton J. **1999**. "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales". Editions *TEC & DOC*, 3^{ème} édition, PP. 783- 785.
- [33] Recensement **2008** de la population algérienne, sur le site de l'office national des statistiques (ONS).
- [34] Cheriti A. **2000**. "Plantes médicinales de la région de Bechar, Sud-ouest Algérien: étude ethnopharmacologique", *Rapport CRSTRA*, Algérie.
- [35] Rodrigues E., **2007**. "Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology* 111, 295–302.

- [36] Said O., Khalil K., Fulder S., Azaizeh H. **2002**. "Ethnopharmacological survey of medicinal herbs, the Golan heights and the west bank region". *Journal of Ethnopharmacology*. 83, 251- 265
- [37] Messaoudi S. **2008**. "*Les plantes médicinales*", P. 114. Dar el fikr, Tunis.
- [38] Le Floch E. **1983**. "Contribution à une étude ethnobotanique de la flore Tunisienne". Tunisie. Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, p. 106
- [39] Cheieb M., Boukhris M. **1998**. "Flore succinite et illustré des zones arides et sahariennes de la Tunisie". L'or du temps, Tunis. p.170.
- [40] Cheriti A. **2009**. "L'ethnopharmacologie en Algérie: entre héritage et valorisation". *PhytoChem & BioSub Conference*. Bechar 04-05decembre.

CHAPITRE IV

*INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE
ET EVALUATION BIOLOGIQUE DE
Moricandia arvensis ET Zilla macroptera*

I- Investigation phytochimique

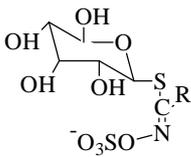
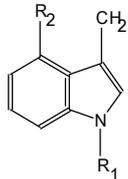
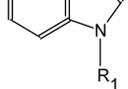
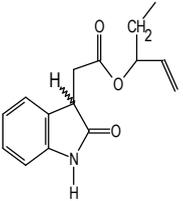
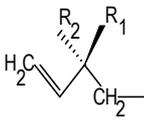
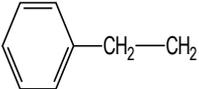
1. Phytochimie des Brassicaceae (Etudes antérieures): Les métabolites secondaires des végétaux, dépassant actuellement 100000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales: les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes [1,2].

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs [1,2].

La recherche bibliographique réalisée sur la famille Brassicaceae montre que la majorité des études phytochimiques effectuées révèle sa richesse en métabolites secondaires notamment les glucosinolates (plus de 100 structures), les flavonoïdes et les stérols.

1.1. Les glucosinolates : Plusieurs espèces de la famille Brassicaceae contiennent les glucosinolates (Tab.4.1).

Tab.4.1 : Structures de quelques glucosinolates isolés

		
Nom	R	Source
Glucobrassicine R ₁ =R ₂ = H		<i>Brassica napus</i> [3]
4-méthoxyglucobrassicine R ₁ =H, R ₂ =OCH ₃		<i>Isatis tinctoria</i> [4]
Glucosatisine		<i>Isatis tinctoria</i> [4]
Progoitrine R ₁ =H, R ₂ =OH		<i>Isatis tinctoria</i> [4]
Gluconapine R ₁ =R ₂ =H		<i>Brassica napus</i> [3]
Gluconasturtine		<i>Brassica Oleracea</i> [5]

Les glucosinolates sont responsables dans des cas de l'activité anticancéreuse [3,6], mais aussi de la toxicité de ces espèces [1,3]. Les thiocyanates minéraux, captent l'iode et empêchent sa fixation thyroïdienne. Pour d'autres espèces c'est la goitrine résultant de l'hydrolyse de la progoitrine, qui inhibe l'incorporation de l'iode et la formation de la thyroxine [1].

1.2. Les acides organiques : Ce sont aussi les constituants à peu près constants des végétaux. Ils agissent comme laxatifs légers.

-*Acides phénoliques*: une étude chimique, effectuée sur l'extrait méthanolique des fruits de *Bereava orientalis* [7], a révélé la présence de six dérivés d'acide benzoïque (fig.4.1).

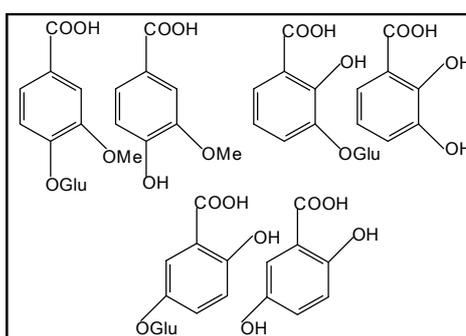


Fig.4.1. Structures de six dérivés d'acide benzoïque isolés[7].

Dans plusieurs études (tableau 4.2), a été démontrée la distribution de nombreux dérivés d'acide cinnamique dans différentes espèces de la famille Brassicaceae.

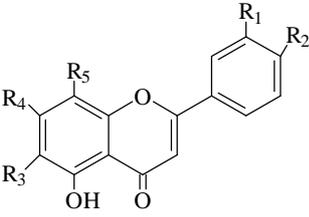
Tab. 4.2 : Distribution de dérivés des acides cinnamiques dans la famille des Brassicaceae.

				R1:	R2:
R	R'	R''	R'''	Nom	Source
H	OH	H	Gen	1-O-E-caféoyl-β-gentiobiose	<i>Brassica napus</i> [8]
Me	OH	OH	Glu	1-O-E-(5-hydroxyféruoyl)-β-glucoside	<i>B. napus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> [8]
H	OH	OMe	Glu	1-O-E-sinapoyl)- β-glucoside	<i>B. napus</i> , <i>A.thaliana</i> <i>Raphanus sativus</i> [8]
Me	OH	OMe	R1	Sinapoylamate	<i>B. napus</i> , <i>A.thaliana</i> [8]
Me	OH	OMe	R2	Sinapine	<i>R.sativus</i> , <i>A.thaliana</i> [8]
Me	OGlu	OMe	R2	Sinapine-O-glucoside	<i>Alliaria officinalis</i> [9]
H	OH	H	Glu	1-O-E-caféoyl-β-glucoside	<i>Moricandia arvensis</i> [10]
H	OGlu	H	Glu	β-glucosyl 4-O-β- glucosyl caféate	
Glu	H	OH	Me	Methyl-3-O-β-glucosyl-5-hydroxycinamate	
H	OGlu	H	Me	Methyl-4-O-β-glucosyl caféate	

Acides gras: Des études chimiques effectuées sur 15 espèces de Brassicaceae [11, 12] ont révélé la richesse de ces dernières en acides gras tels que: l'acide linoléique (*Matthiola incana*, *Lepidium sativa*) et l'acide érucique (*Sinapis alba*).

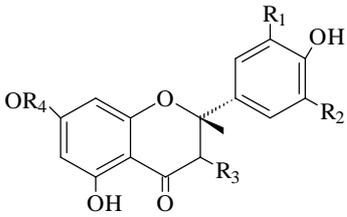
1.3. Les flavonoïdes : En exploitant notre base de données EDACHRA (Electronic DATA on Chemical Resonance & Activity) [13], nous avons pu recenser plusieurs flavonoïdes isolés de différentes espèces de la famille des Brassicaceae.

Tab.4.3 : Structures de quelques flavones

						
Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Source
Luteoline 7-O-di glucoside	OH	OH	H	O-Glu-Glu	H	<i>Porodiodoxa chionophilum</i> [14]
Apigénine 6, 8-di-C-glycoside	H	OH	Glu	OH	Glu	
Lutoline 7-O-Glucoside	OH	OH	H	O-Glu	H	
Luteoline	OH	OH	H	OH	H	<i>Thlaspi arvense</i> [2]
Apigénine	H	OH	H	OH	H	

Le tableau 4.4 rassemble quelques flavanones et flavanols isolés de quelques espèces de la famille des Brassicaceae.

Tab.4.4: Structures de quelques flavanones et flavanols

						
Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Source	
Dihydrokaempferol	H	H	OH	H	<i>Mathiola incana</i> [15]	
Dihydrokaempferol 7-O-glucoside	H	H	OH	Glu		
Naringénine 7-O-glucoside	H	H	H	Glu		
Naringénine	H	H	H	H	<i>Brassica carinata</i> [16]	
Dihydromyricétine	H	OH	OH	H		
Dihydroquercétine	OH	H	OH	H		

Le tableau 4.5 rassemble quelques flavanols isolés de quelques espèces de la famille des Brassicaceae.

Tab.4.5 : Structures de quelques flavonols

Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Source
Kaempferol	H	H	H	H	H	H	<i>Sinapis alba</i> [2]
Isorhamnetine	OMe	H	H	H	OH	H	
Quercetine	OH	H	H	H	H	H	
Kaempferol 3-O-sophoroside-7-O-(2-O-E-sinapoyl-β-glucoside)	H	H	soph	H	R	H	<i>Brassica napus</i> [8]
Kaempferol 3-(2-O-E-sinapoyl sophoroside) -7-O-β-glucoside	H	H	R'	H	Glu	H	
Kaempferol 3-O-sophoroside-7-O-β-glucoside	H	H	soph	H	Glu	H	
Isorhamnetine 3-O- sophoroside-7-O- glucoside	OMe	H	soph	H	Glu	H	<i>Sinapis arvensis</i> [17]
Isorhamnetine 7- glucoside	OMe	H	H	H	Glu	H	
Isorhamnetine 3,7-O-di-β- glucoside	OMe	H	Glu	H	Glu	H	
3,5,6,7,8-pentahydroxy-4'-methoxyFlavone	H	OH	H	Me	H	OH	<i>Brassica alba</i> [18]
3,5,6,7,8-pentahydroxyFlavone	H	H	H	OH	H	OH	
Moricandine	OH	Gl	Glu	H	Rha	H	<i>Moricandiaa arvensis</i> [10]

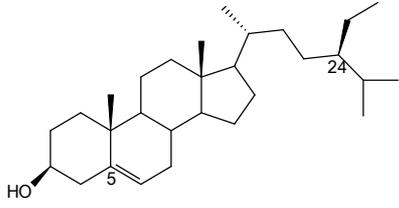
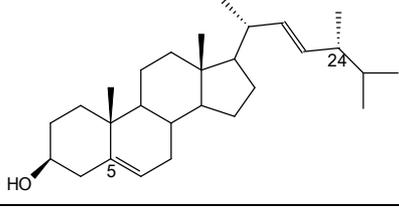
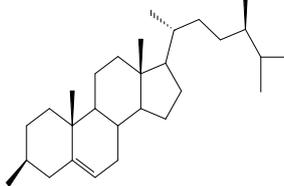
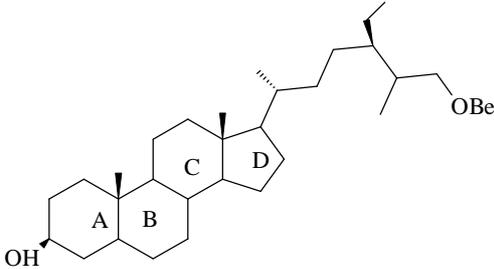
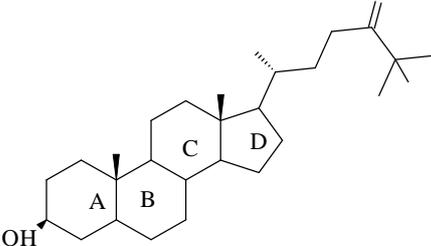
1.4. Les terpenes, phytosterols et saponines: Les terpénoïdes sont largement distribués dans la nature, ils peuvent être considérés comme des dérivés des oligomères de l'isoprène. On classe ces molécules en: Monoterpènes, Sesquiterpènes, Diterpènes, Triterpènes,... Certains triterpènes évoluent en stéroïdes [19].

Beaucoup d'espèces de la famille des Brassicaceae contiennent les mono- et les sesquiterpènes. L'étude de l'huile essentielle de l'espèce *Arabidopsis thaliana*, a révélé la présence de 24 monoterpènes et 26 sesquiterpènes [19]. Une autre étude chimique effectuée sur les fleurs de *Herperis matronalis* a permis d'identifier 12 monoterpènes [20].

Le sitostérol et le stigmastérol, sont les phytosterols les plus rencontrés chez les plantes supérieures, ils représentent plus de 80% des stérols existants [21]. Le brassicastérol trouvé principalement dans la famille des Brassicaceae est représenté par un taux de 10% [21].

Les saponines sont peu présentes dans la famille des Brassicaceae. En effet des études réalisées sur l'espèce *Erysimum cheirathoides*, ont permis d'isoler quelques saponines [22,23].

Tab.4.6 : Structures de quelques phytosterols isolés

Nom	structure	Origine
Sitostérol (Δ^5)		<i>Brassica napus</i> [24]
Brassicastérol ($\Delta^{5,22}$)		<i>Brassica napus</i> [25]
Campestérol		<i>Brassica campestris</i> [21]
Stigmast-5-en-3-β-27-diol,27-benzoate		<i>Lepidium sativum</i> [26]
24-méthylène-25-méthylcholesterol		<i>Brassica juncea</i> [26]

Le brassinolide est le composé le plus actif des stéroïdes hormonaux, caractérisé par la présence d'une fonction lactone sur le cycle B, il a été isolé pour la première fois du pollen de *Brassica napus* (Navet) en 1979 [27].

L'exploitation de l'extrait chloroformique de la plante *Psuderucaria teritifolia* (Brassicaceae) a permis d'isoler le β -sitosterol [28].

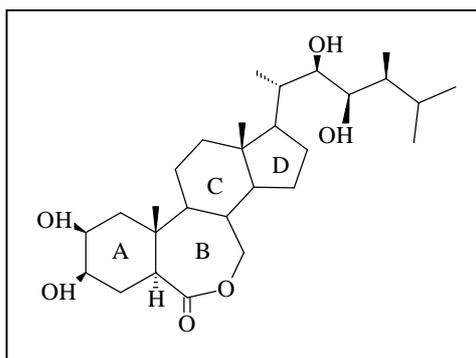


Fig.4.2. Structure de brassinolide

1.5. Les alcaloïdes : Dans les Brassicaceae, les alcaloïdes sont surtout représentés par les tropaniques, les imidazoliques et les indoliques; comme le n-hydroxybenzolytropane isolé de *Cochlearia arctica* [29], la Cochlearine et la tropine isolées de *Cochlearia officinalis* [30].

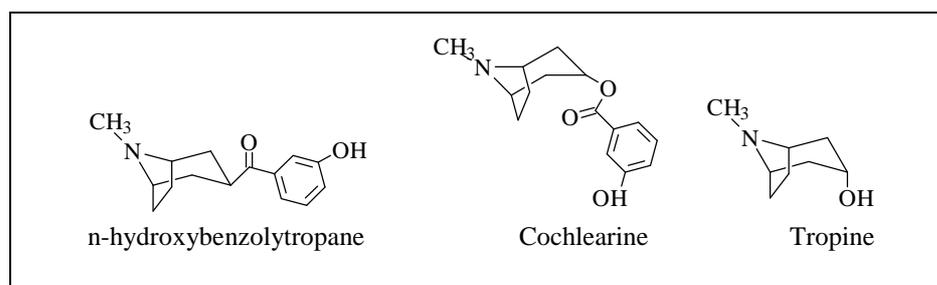


Fig.4.3: Structures de quelques alcaloïdes isolés

1.6. Les constituants minéraux: Une étude [31], visant la valeur nutritive de quelques espèces pastorales en milieu semi-aride et aride de l'Afrique, a donné les résultats suivants pour *Moricandia arvensis* (tableau 4.7).

Tab.4.7 : Valeur nutritive de *M.arvensis*[31]

% Matière sèche				Extrait non azoté	P	Ca	K	Na	Matière azotée digestible g/ kg	Unité fourragère Kg
Matière Minérale	Matière cellulosique	Matière Azotée	Matière grasse							
29,8	13,0	30,9	5,6	20,7	0,34	5,70	3,36	0,82	85	0,25

2. Matériels et méthodes

2.1. Etude phytochimique

2.1.1 Matériel végétal: La partie aérienne de *Z. macroptera* a été récoltée durant les périodes de floraison, de février et mars 2009-2010-2011-2012; la récolte de *M. arvensis* a été réalisée entre

le mois de décembre 2009 et de janvier 2010. Les deux espèces ont été identifiées par le professeur Maarouf A. du centre universitaire de Naama et ont été récoltées de la région de Oued Bechar.

Des échantillons des deux plantes sont déposés dans l'herbier du laboratoire de phytochimie et synthèse organique (LPSO, Université de Bechar) sous les codes CA02/32 et CA00/71 pour *M.arvensis* et *Z.macroptera* respectivement.

Les parties récoltées ont été séchées dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires. Le matériel végétal séché est réduit en poudre (feuilles de *M. arvensis*) et en petits morceaux (partie aérienne de *Z. macroptera*) à l'aide d'un broyeur.

2.1.2. Screening phytochimique

A. Produit végétal épuisé avec le HCl dilué

a- Recherche des alcaloïdes: On met 5g de matière végétale dans un bêcher, avec 50 mL de HCl (10%) dilué et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 minutes, puis on filtre le mélange, pour les tests suivants [32]:

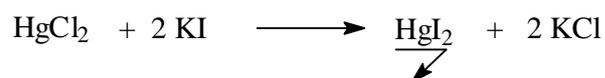
-A l'extrait acide, on ajoute l'ammoniaque (NH₄OH (10%)) pour alcaliser le milieu et à l'aide d'une ampoule à decanter, on extrait la solution avec 30 mL de chloroforme (CHCl₃). On évapore la phase organique puis on ajoute 2 ou 3 gouttes du réactif de Valsner Mayer. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

- Si on ajoute 4 ou 5 gouttes du réactif de Wagner ou de Bouchardat (solution d'iodure de potassium iodé) au mélange initial, la présence des alcaloïdes sera indiquée par l'apparition d'un précipité brun.

Les alcaloïdes sont des substances azotées agissant comme des bases donnant des réactions de précipitation: en solution acide (pH 1 et 2), les sels d'alcaloïdes donnent avec les composés iodés des métaux lourds, des précipités colorés caractéristiques.

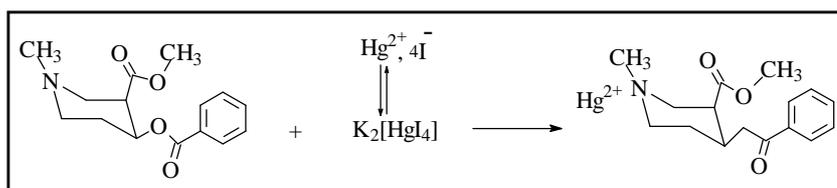
Mécanisme

1- Avec le réactif de Mayer: L'iodure de potassium forme avec l'ion Hg²⁺ un précipité rouge-orangé HgI₂ selon la réaction suivante:

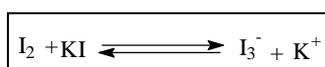
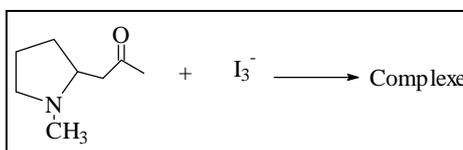


Le précipité se dissout dans un excès de solvant en donnant l'ion complexe [HgI₄]²⁻ selon la réaction suivante:



Exemple:

2 - Avec le réactif de Wagner: L'iode est peu soluble dans l'eau, l'ajout du KI permet d'augmenter sa solubilité. Il se forme l'ion I_3^- selon la réaction suivante:

**Exemple:**

b- Recherche des flavonoïdes: Dans un flacon, on met 5g de matière végétale avec 75 mL d'acide chlorhydrique (HCl) et 10 mL d'éthanol (EtOH). On laisse macérer pendant 2 jours, on filtre le mélange puis on soumet le macéra aux tests suivants [1, 32]:

1- On alcalinise 10 mL de filtrat par l'ammoniaque (NH_4OH). L'apparition de la couleur jaune claire indique la présence des flavonoïdes.

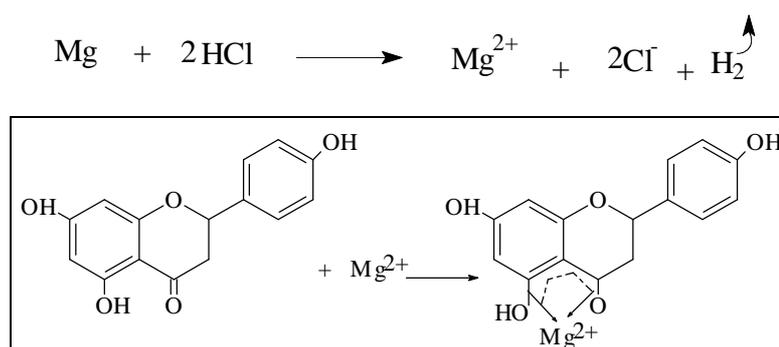
2- A 10 mL du filtrat, on ajoute 5 mL de l'alcool amylique, la phase alcoolique se colore en jaune indique la présence des flavonoïdes libres.

3- Après évaporation sous vide de la phase aqueuse du premier test, on dissout le résidu avec 3 mL de HCl dilué et on chauffe légèrement puis on refroidit pour réaliser les tests suivants:

* On ajoute 2,5 mL d'alcool amylique. L'apparition de la couleur jaune indique la présence des flavonoïdes hétérosidiques.

*On ajoute une petite quantité de magnésium (Mg) à l'extrait d'acide chlorhydrique. L'apparition de la couleur rouge indique la présence des flavonoïdes (rouge violacé (flavonones) et rouge cerise (flavonols)).

Caractérisation: De nombreuses réactions colorées existent pour caractériser les flavonoïdes. Il existe une coloration plus spécifique dite réaction de la cyanidine : Les flavonoïdes donnent généralement avec le magnésium en présence de l'acide chlorhydrique une coloration rose ou rouge selon la structure chimique des flavonoïdes mis en jeu.

Mécanisme**Fig. 4.4:** Reaction de formation de l'ion complexe**B. Produit végétal épuisé avec l'eau distillée**

a-Recherche des saponosides: Dans un bêcher, on met 3 à 5 g de matière végétale en présence de 20 mL d'eau distillée et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 10 min à une température inférieure à la température d'ébullition. Après filtration du mélange, on soumet l'extrait aux tests suivants:

On met 10 mL de la solution dans un tube à essai, on agite bien pendant une minute puis on laisse reposer quelques secondes et on mesure la hauteur de la mousse [32].

- pas de mousse (-)
- hauteur de mousse moins de 2cm (+)
- hauteur de mousse entre 2 cm et 2.5 cm (++)
- hauteur de mousse plus de 2.5 cm (+++)

Les réactions générales de détection des saponosides sont les suivantes:

- L'acide sulfurique concentré dissout les saponosides et se colore successivement en jaune, rouge, bleu vert ou bleu violet. Additionné d'acide sélénieux ($\text{H}_2\text{O}_3\text{Se}$), il fournit une coloration rouge cerise.

- Avec le tétranitrométhane ($\text{C}(\text{NO}_2)_4$) en solution chloroformique la teinte observée est jaune.

Pratiquement, aucune de ces réactions n'est spécifique. Elles sont positives pour toutes les structures polycycliques [33].

On pourrait distinguer les saponosides triterpéniques des saponosides stéroïdiques par le réactif de Rosenthaler (vaniline à 1% dans l'acide chlorhydrique) qui engendrerait, plus ou moins vite et suivant la température, une coloration lilas en présence d'un polyterpène.

Le trichlorure d'antimoine (SbCl_3) en solution chloroformique permettrait également une distinction entre les saponosides triterpéniques et stéroïdiques. En effet, l'examen en lumière ultraviolette révélerait une fluorescence bleue pour les saponosides triterpéniques, et jaune pour les stéroïdiques. En outre le procédé le plus classique et le plus employé est certainement celui

qui utilise la réaction de Liebermann Burchardt: Mélanger 5 mL de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C. S'il s'agit d'un dérivé stéroïdique, le test donne une coloration verte plus ou moins immédiate. Dans les mêmes conditions, les dérivés triterpéniques donnent une coloration rouge [1, 32].

Mécanisme: Lors de la caractérisation des saponines en milieu aqueux, la formation d'une couche hydrophobe est expliquée par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes entre un ou plusieurs groupes hydroxyles ou carboxyliques de saponine et les molécules d'eau.

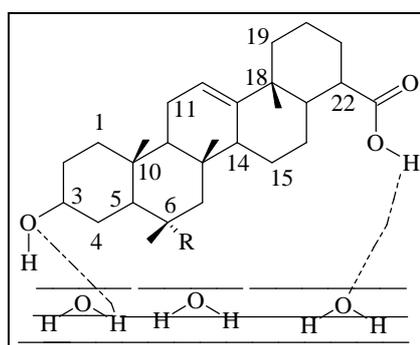


Fig.4.5: Comportement des saponines en milieu aqueux [33]

b-Recherche des anthraquinones: Dans un bêcher, on met 1 g d'échantillon de la plante en présence 10 mL de KOH (0,5 N) auxquels est ajouté 1 mL de H₂O₂ et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 10 min. Après refroidissement du mélange, on le filtre puis on acidifie le filtrat avec l'acide acétique. On extrait la solution acide obtenue avec 10 mL de benzène. On agite l'extrait benzénique en présence de 5 mL de NH₄OH. Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

La caractérisation des anthraquinones fait appel à la réaction de Bornträger. Cette réaction n'est positive qu'avec les formes anthraquinoniques libres. Pour mettre en évidence les hétérosides par cette réaction, il faudra donc les soumettre à une hydrolyse préalable pour obtenir l'aglycone et l'ose.

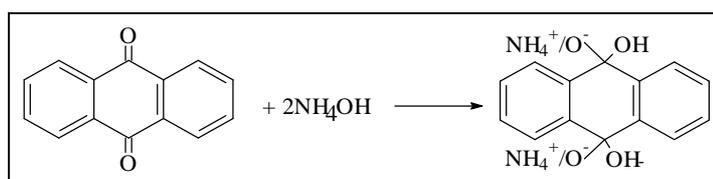


Fig. 4.6: Reaction de caractérisation des anthraquinones

c- Recherche des cardinolides: 3g d'extrait de matière végétale macérée dans 20mL d'eau distillée pendant 24 heures. On filtre la solution, puis on fait une extraction de 10 mL du filtrat avec 10 mL du mélange chloroforme/ethanol. On évapore la phase organique et on dissout le résidu dans 3mL d'acide acétique glacial, on ajoute quelques gouttes de FeCl₃ et 1mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition de la couleur bleue verte dans la phase acétique indique l'existence des cardinolides.

C. Produit végétal épuisé avec l'éthanol 50 %

a -Recherche des tannins: Dans un bêcher, on met 3g de matière végétale avec 20 mL d'éthanol 50%, on chauffe l'ensemble pendant 15 minutes, on filtre le mélange puis soumettre le filtrat aux tests suivants: On traite 5 mL de la solution avec quelques gouttes de FeCl₃. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - noire, verte ou bleue- verte et un précipité, selon que les tanins sont catéchiques, galliques ou ellagiques.

Caractérisation: Avec les sels ferriques, les tanins galliques et les tanins éllagiques donnent des précipités bleu-noirs et les tanins condensés des précipités brun-verdâtres.

- Les tanins galliques donnent une coloration rose avec KIO₃ (l'acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).
- Les tanins éllagiques sont colorés par l'acide nitreux (HNO₂) en milieu acétique (rose, la coloration vire au pourpre puis au bleu).
- Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique [1].

b-Recherche des composés réducteurs: On traite 3 mL de l'extrait éthanolique avec 5 mL d'eau distillée et quelques gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique.

- On traite 1 mL de l'extrait éthanolique avec le réactif de Keller Kiliani. Un test positif est révélé par la formation d'un anneau brun - rouge et la solution acétique se colore lentement en bleu - vert.

c-Recherche des coumarines, anthracénosides et anthocyanosides[33]: On prend 20 mL de l'extrait éthanolique en présence de 10 mL de HCl (10%), on les porte à reflux pendant 30 minutes. Après refroidissement de la solution, elle subit l'extraction 3 fois avec 10 mL d'éther diéthylique.

-Coumarines : On évapore 5 mL de la solution extractive étherique et on dissout le résidu dans 2 mL d'eau chaude. On garde le demi volume comme témoin et on ajoute à l'autre volume 1 mL de NH₄OH (10%). On peut aussi mettre 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à

essai. On couvre le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et on le place dans un bain-marie pendant quelques minutes.

- La CCM de drogue à coumarine présente des taches dont la coloration exaltée en présence d'ammoniac, varie du bleu au jaune et au pourpre.

- L'examen sous UV donne une fluorescence intense des solutions extractives (la révélation se fait en milieu alcalin).

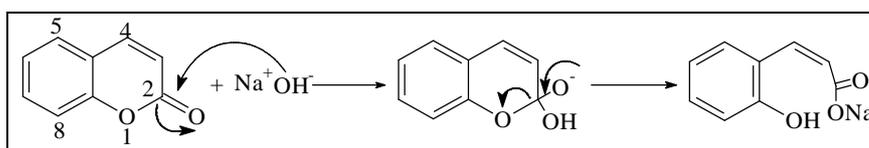


Fig.4.7: Mécanisme de réaction des coumarines avec NaOH

-**Anthracénosides** : On traite 8 mL de la solution extractive étherique par le réactif de Borntrager. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée - rouge au violet - pourpre.

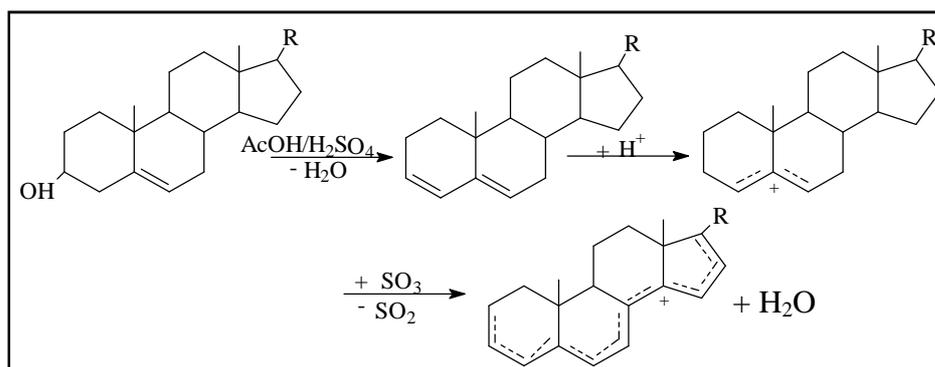
- **Anthocyanosides**: On dose la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. La présence des anthocyanosides est confirmée par le virage de couleur (du rouge en bleu) en fonction du pH.

D. Produit végétal macéré avec l'éthanol 70%

-**Recherche des stérols**: Dans un flacon, on met 5g de matière végétale avec 20 mL d'éthanol laisser macérer pendant deux jours.

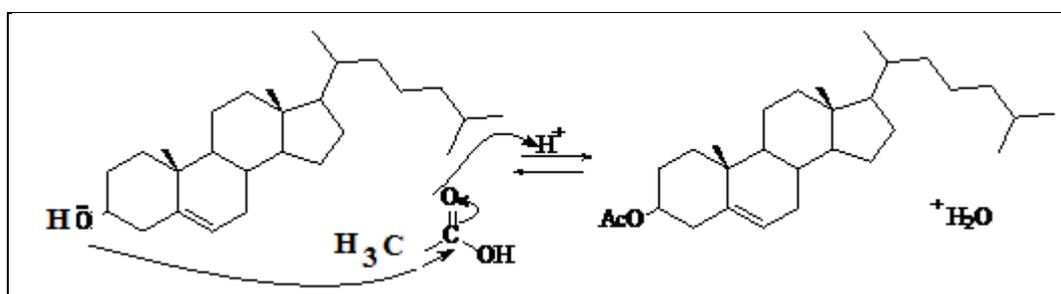
Après l'évaporation de la solution, on dissout le résidu avec 15 mL de chloroforme (CHCl_3) et on filtre plusieurs fois (3 fois), puis on divise le filtrat en trois parties dans trois tubes à essai:

a-Test de Salkowski : On met dans le premier tube, une partie du filtrat, on ajoute 1 à 2 mL de H_2SO_4 . On agite le mélange légèrement et on note le changement graduel de coloration [1]. Dans ce test on met en évidence les stérols insaturés par une réaction qui provoque l'apparition d'une coloration rouge: l'addition d'acide sulfurique concentrée entraîne l'élimination d'une molécule d'eau et conduit à la formation d'insaturation supplémentaire [1, 32].

Exemple:**Fig.4.8:** Reaction de formation d'insaturation supplémentaire [33a]

b-Test de Liebermann-Burchard : Dans le deuxième tube, on additionne un mélange de chloroforme et d'anhydride acétique (1/1) (v/v) à la deuxième partie du filtrat, puis on agite légèrement. On ajoute une goutte de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration rose est indicative de la présence de triterpènes pentacycliques ou de stéroïdes

Le groupement (OH) en 3 est protégé par addition d'anhydride acétique. Cette réaction est suivie soit d'une isomérisation soit d'une transposition moléculaire, ce qui provoque le changement de coloration [1, 32, 33a].

**Fig.4.9:** Mécanisme d'acétylation

c-Test de Badjet-Kedde : Dans un troisième tube, on met la troisième partie du filtrat avec quelques grains d'acide picrique ($(\text{NO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2\text{-OH}$). L'apparition d'une coloration orange indique la présence des stéroïdes lactoniques [33].

L'addition d'acide picrique entraîne l'ouverture du cycle lactonique insaturé puis formation de complexe entre l'hydrocarbure et l'acide picrique [1, 34].

E- Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, on met 50 g du produit végétal en présence de 300 mL d'éther diéthylique. On porte l'ensemble à reflux pendant 2 heures. Après filtration le mélange sera soumis aux tests suivants:

a-Recherche des huiles volatiles: On évapore 20 mL de solution éthérique. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme. Concernant le résidu gras, ce dernier est saponifié. En fin de réaction, on ajoute un peu d'eau et on extrait la solution avec l'éther diéthylique..

b-Recherche d'acides gras: On acidifie la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution éthérique est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

2.1.3. Extraction**2.1.3.1. Extraction à partir de *M. arvensis*:**

A/Premier protocole: 100g de feuilles broyées ont été mis à macérer dans un mélange de 600 mL (EtOH/H₂O) dans les proportions 80/20 (v/v), sous agitation pendant 48h (schema: 4.1).

Après filtration (simple et sous vide), évaporation de l'EtOH et concentration à une température n'excédant pas 35°C, on ajoute 50 mL d'eau distillée et on laisse agiter pendant 24h.

L'élimination de la chlorophylle se fait par précipitation par le tétraacétate de plomb (CH₃COO)₄Pb. Après quelques heures d'agitation la solution, devenue rouge-brune, est filtrée. Le filtrat est épuisé 3 fois par l'hexane.

Afin de séparer les flavonoïdes en fractions glycosilées et aglycones; la phase aqueuse est mélangée à volume égale avec du chloroforme pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. La phase aqueuse restante subit une série d'extraction avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes aglycones, mais surtout les mono et les diglycosidiques. Les extraits obtenus sont dénommés selon le solvant qui a permis leur séparation: extrait hexanique, extrait chloroformique et extrait d'acétate d'éthyle (schema 4.1). Les trois fractions récupérées ont été séchées sur (Na₂SO₄ anhydre) et sont soumises à une concentration à basse pression à 35°C puis pesées pour déterminer les rendements d'extraction exprimés par rapport à 100g de matière sèche.

B/Deuxieme protocole: Dans un ballon de 1000 mL surmonté d'un réfrigérant à reflux, on met 200 g de la plante (feuilles broyées) en présence de 400 mL d'hexane. On porte l'ensemble à reflux pendant 4 h. On filtre, ensuite on évapore le solvant.

Dans un ballon de 1000 mL surmonté d'un réfrigérant à reflux, on met 150 g de matière végétale dégraissée par l'hexane (Marc) en présence de 350 mL du mélange eau-acétone (20/80). On porte l'ensemble à reflux pendant 4 à 6 h, on filtre puis on évapore l'acétone à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait aqueux de couleur marron, a été mis à une extraction liquide-liquide avec l'éther diéthylique puis avec l'acétate d'éthyle et en fin avec le butanol. L'ensemble des opérations d'extraction décrites précédemment, est illustré par le schéma: 4.2.

2.1.3.2. Extraction à partir de *Z. macroptera*:

A/Premier protocole: 170g de matériel végétal sont mis en contact avec un mélange de 1700 mL d'un mélange d'eau distillée et d'éthanol (50/50 (v/v)) avec agitation pendant 48 heures et conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante. Cette solution extractive a été filtrée puis évaporée (à 50%), le résidu obtenu est laissé au repos pour l'épuisement total du solvant. L'opération de la macération a été répétée trois fois, en renouvelant le solvant, pour augmenter la masse de l'extrait. Le macérat de couleur verte est fractionné successivement par quatre (4) solvants: L'hexane (5x 50 mL) pour le dégraissage, le chloroforme (3 x 50 mL), l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL) et le butanol (3 x 50 mL) (schéma:4.3).

B/Deuxieme protocole: Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, on met 60g de matière végétale avec 600 mL d'un mélange méthanol/eau (70/30 (v/v)) et on porte l'ensemble à reflux pendant 4 à 5 heures. Après filtration et évaporation par un évaporateur rotatif à 30% du volume total, on fait subir à l'extrait aqueux obtenu une série d'extraction liquide-liquide par les solvants: L'hexane (3x 30 mL) pour le dégraissage, l'éther diéthylique (3x 30 mL), l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL) et le butanol (3 x 30 mL) (schéma:4.4).

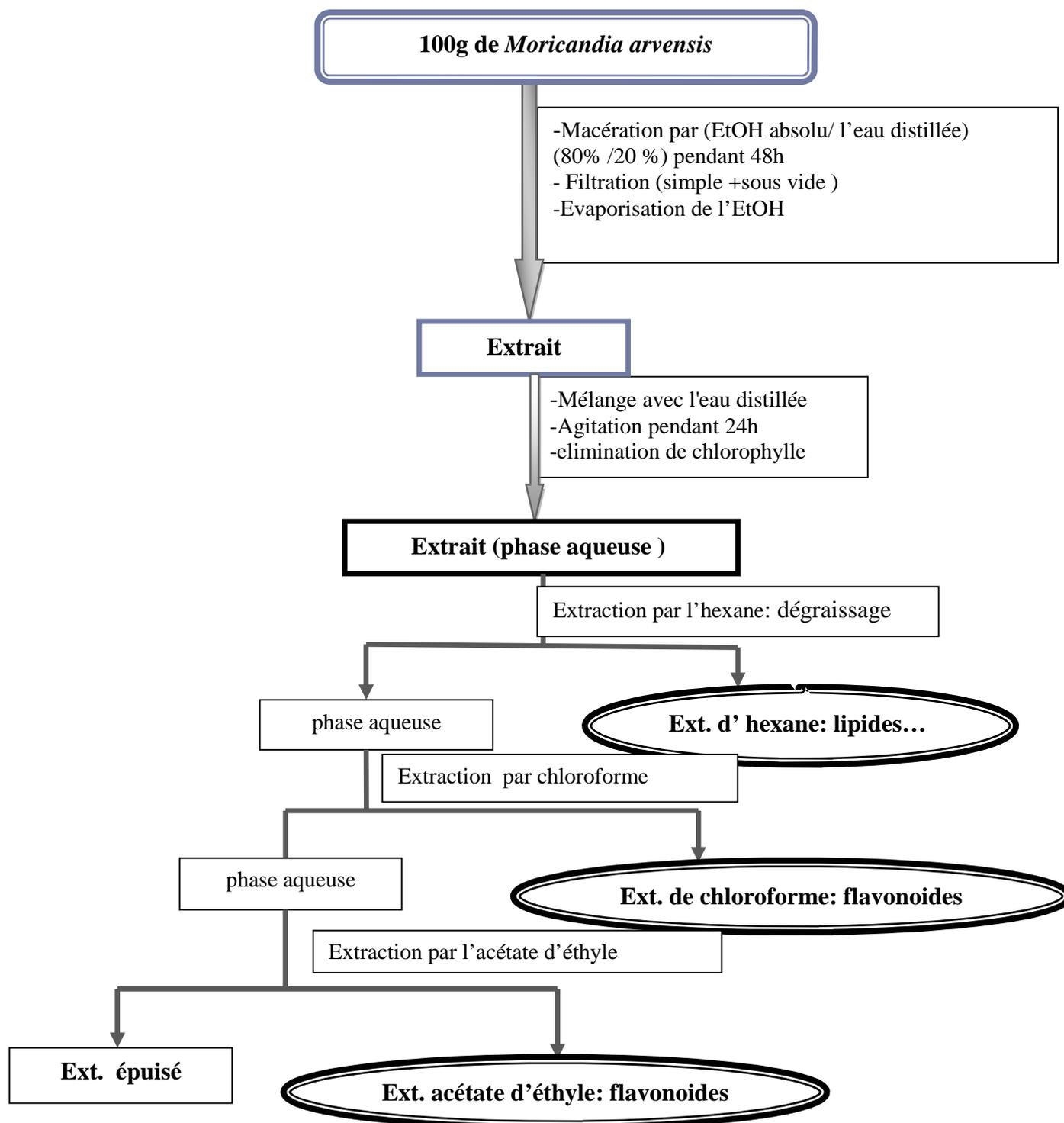


Schéma 4.1: Etapes de l'extraction à partir de *M. arvensis* (1er protocole)

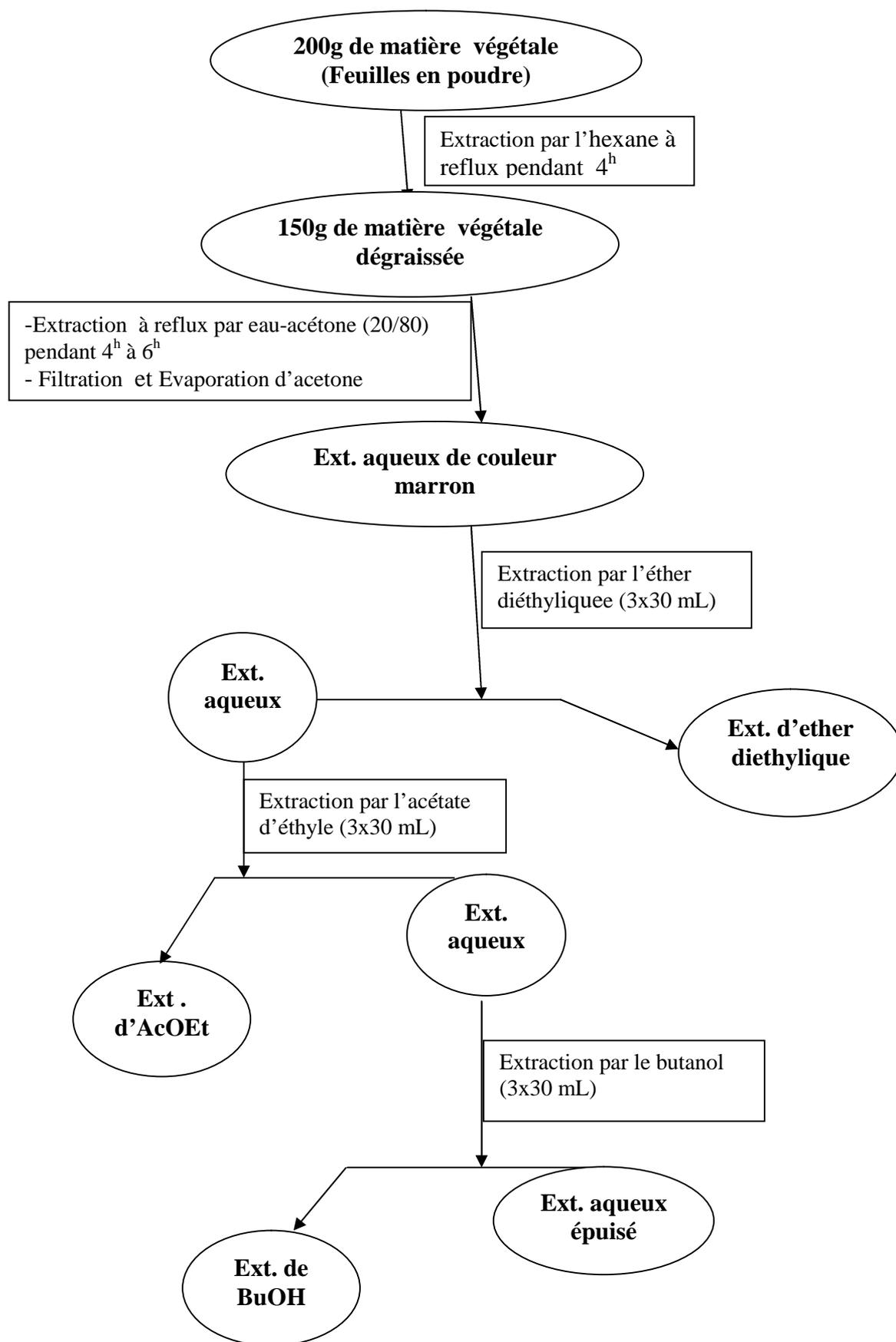
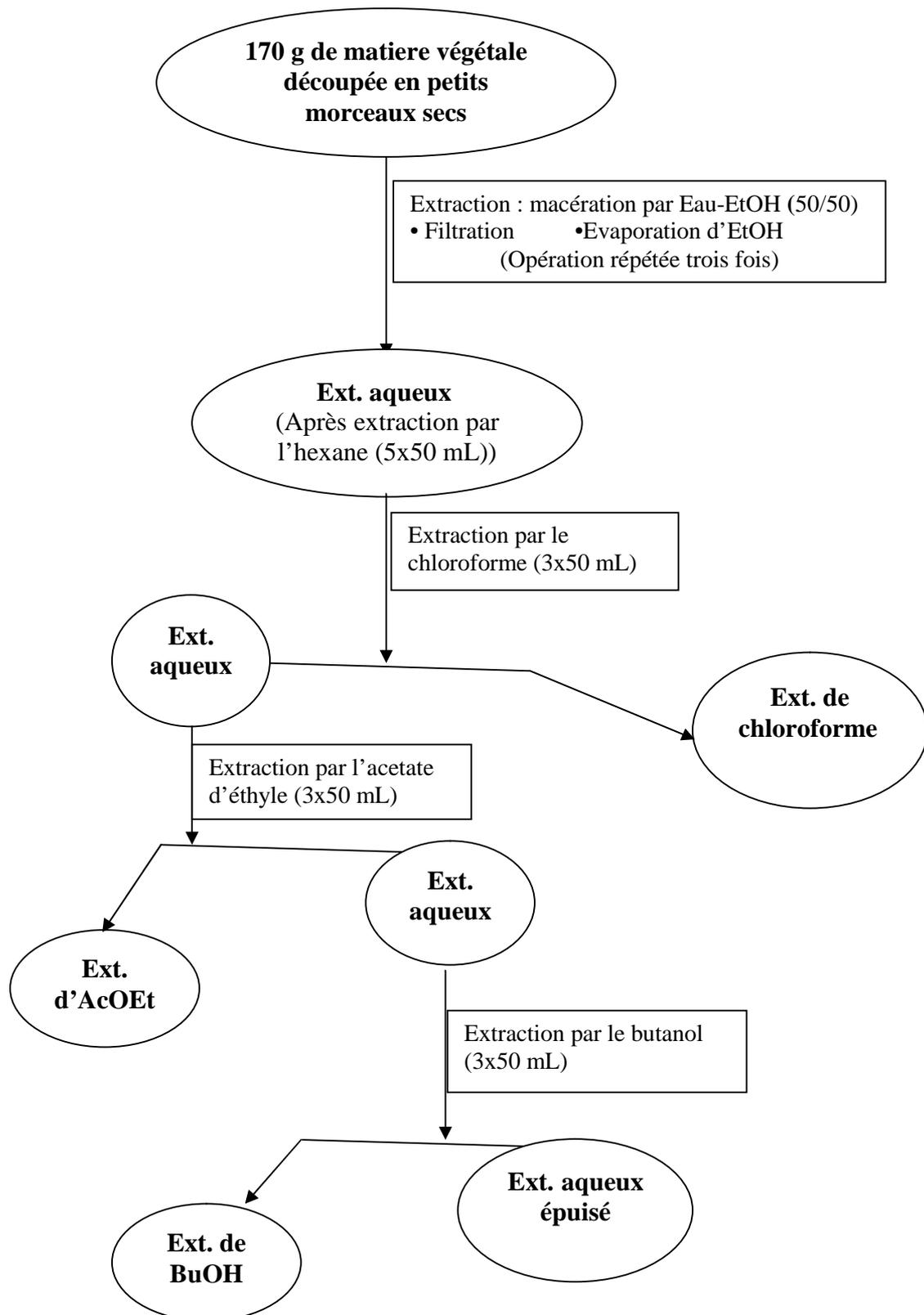
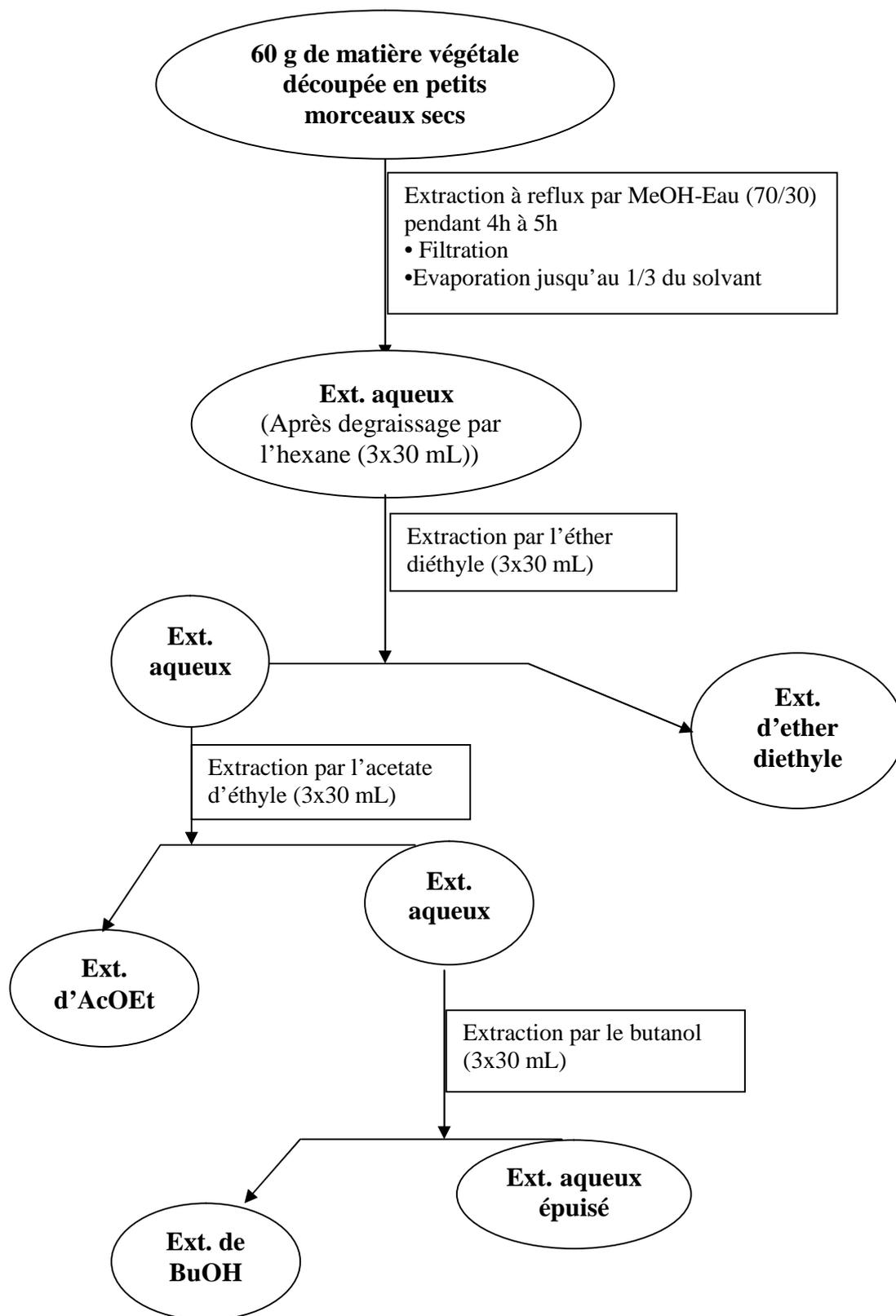


Schéma 4.2 : Différentes étapes de l'extraction à partir de *M.arvensis* (2ème protocole)

**Schema4.3:** Etapes de l'extraction à partir de *Z. macroptera* (1er protocole)



Schema 4.4: Etapes de l'extraction à partir de *Z. macroptera* (2ème protocole)

2.2. Méthodes chromatographiques analytiques

2.2.1. *Chromatographie sur couche mince (CCM)*: Nous utilisons essentiellement des plaques de silice Kieselgel (Silicagel) 60 F254, prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck).

Les systèmes de solvant les plus couramment employés avec ces plaques sont les suivants:

-Extraits apolaires : éther de pétrole/acétate d'éthyle (1:1)

-Extraits polaires: acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/eau (100:11:11:27)

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et peuvent être adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

Les plaques sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés (H₂SO₄, Iode, AlCl₃...). L'utilisation de différents réactifs vaporisés sur les plaques de chromatographie sur couche mince après élution, permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule.

2.2.2 *Chromatographie sur colonne ouverte*: Des colonnes ouvertes de gel de silice en phase normale (60-320 mesh) ont été utilisées dans les étapes de fractionnement des extraits. Pour la majorité de nos travaux nous avons utilisé une colonne de 20 mm de diamètre et 60 cm d'hauteur. La taille et le diamètre de la colonne, le débit de la phase mobile et le volume des fractions sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

La quantité de phase stationnaire utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner peut être déposé en phase liquide concentrée (dans un solvant peu éluant) ou en phase solide (adsorption sur silice). Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyse sur CCM.

2.3. Les techniques d'identification structurale

2.3.1. *Spectrophotométrie ultra-violet (UV)*: Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre UNICAM UV 300 et un spectrophotomètre UV SPECORD 200 PLUS, double faisceau permettant des lectures directes contre liquide de compensation. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1cm. Les longueurs d'ondes sont variées entre 100 et 400 nm.

a- Protocole: La solubilisation de l'échantillon est réalisée avec du méthanol très pur ou de l'éthanol à 95%. La concentration idéale pour l'obtention d'un bon spectre est d'environ 40 mg/L. Pour y parvenir, on pèse sur une balance de précision 2 mg de produit que l'on solubilise dans 2 ml de solvant. On prélève exactement 1 mL de cette solution (soit 1 mg de l'échantillon) pour le diluer dans une fiole jaugée de 25 mL. La concentration du produit est alors de 40 mg/L. Une petite quantité du produit est diluée dans du MeOH jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Les réactifs de déplacement sont préparés comme suit [35-36]:

- Solution aqueuse de soude à 0.5 N
- 5 g de chlorure d'aluminium (AlCl_3), anhydre est délicatement dissous dans du MeOH (100 mL).
- 50 mL d'acide chlorhydrique conc. (HCl 37%) est dilué dans 100 mL de H_2O .
- Acétate de sodium (AcONa): anhydre en poudre.
- Acide borique (H_3BO_3): solution aqueuse à 5%.

b -Lecture des spectres: Le spectre du flavonoïde pur dilué est mesuré (spectre en "MeOH").

-Première étape: Quelques gouttes de solution de NaOH (0,5N) sont ajoutées dans la cuve contenant le flavonoïde dans le méthanol et après homogénéisation, le spectre "MeONa" est enregistré. Le spectre "MeONa" est relu après 5 minutes afin de vérifier toute décomposition de la molécule phénolique (Ce reactif déprotone tous les groupes hydroxyles phénoliques).

-Deuxième étape: Dans une autre cellule contenant le flavonoïde dilué, 5 gouttes de AlCl_3 (5%), sont additionnées, l'échantillon mélangé et le spectre " AlCl_3 " enregistré (Ce reactif entraîne la formation de complexes acido-résistants entre les hydroxyles et les cétone voisines et des complexes acido-labiles avec les groupes O-dihydroxyles) ; 3 à 5 gouttes de HCl sont ensuite ajoutées et le spectre " AlCl_3/HCl " mesuré (Ce reactif n'entraîne que la formation des complexes hydroxy-cétoniques).

-Troisième étape: Quelques grains de AcONa anhydre sont ajoutés au flavonoïde dilué jusqu'à saturation.

Le spectre "AcONa" est mesuré (Ce reactif ne déprotone que les groupes hydroxyles les plus acides, par exemple les 4'-OH et 7-OH). Enfin, le spectre "AcONa/ H_3BO_3 " est enregistré après addition de quelques gouttes de H_3BO_3 et homogénéisation, le spectre est enregistré (Ce reactif entraîne la formation de complexes avec les groupes O-dihydroxyles).

Chaque flavonoïde a ainsi été caractérisé par six spectres UV, donnant d'importantes informations sur la structure de la molécule.

2.3.2. *Spectrométrie infrarouge (IR)*: Les spectres infrarouges ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastilles de KBr sur un appareil de type Thermo Nicolet Avatar 320 FT-IR du Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique (Univ. de Bechar). Quelques analyses (IR) ont été effectués au laboratoire de spectrochimie et pharmacologie structurale (Univ. de Tlemcen). Le résultat est un interférogramme, qui est converti mathématiquement en spectre classique infrarouge. Cette technique permet à la fois un temps d'analyse court, une excellente résolution et l'obtention de résultats faciles à traiter [37]. Elle peut également permettre de travailler sur des quantités plus restreintes de produit.

2.3.3. *Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)*: En phytochimie, les deux noyaux les plus étudiés sont l'hydrogène (proton) ^1H et le carbone 13 (^{13}C).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN ^1H et RMN ^{13}C sont enregistrés sur un appareil Bruker-Avance, résonant à (RMN ^1H : 250MHz ou 300MHz, RMN ^{13}C :75MHz ou 125MHz ou 400MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal de tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Les substances à analyser sont dissoutes dans des solvants deutérés (CD_3OD , DMSO- d_6 , CD_3COCD_3 , CDCl_3 ...). Le traitement des spectres est réalisé grâce au logiciel MestRec.

3. Résultats et discussions

3.1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans les parties étudiées des deux plantes 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. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci après (tab. 4.8).

On remarque la présence de la majorité des métabolites secondaires dans les deux espèces. En revanche, on note l'absence des anthraquinones, les composés reducteurs et les anthocyanosides dans l'espèce *M. arvensis* et l'absence des acides gras, des anthraquinones, des coumarines et des stéroïdes dans l'espèce *Z. macroptera*.

Tab. 4.8: Résultats du screening phytochimique

Phytocomposés	feuilles de <i>M. arvensis</i>	Partie aérienne de <i>Z. macroptera</i>
Acides gras	+	-
Alcaloïdes	+	+
Anthocyanosides	-	nt
Anthracenosides	nt	+
Anthraquinones	-	-
Cardinolides	+	+
Composés réducteurs	-	nt
Coumarines	+	-
Flavonoïdes	+	+
Flavonoïdes glycosidiques	nt	+
Huiles essentielles	+	+
Saponosides	+	+
Stéroïdes	+	-
Sterols et terpènes	+	+
Tanins	+	+

+: presence, -: absence, nt: non testé

Les différentes familles existantes dans nos deux plantes justifient leurs utilisations thérapeutiques. En effet, la présence des stéroïdes explique l'utilisation de *M. arvensis* pour calmer les douleurs dues aux céphalées ou au rhumatisme. D'autre part la présence des tanins justifie l'utilisation de *Z. macroptera* pour les troubles gastriques et les maux d'estomac. En analysant les différents extraits de *M. arvensis*, on a pu dresser le tableau 4.9. Les résultats mentionnés en gras sont ceux obtenus par Seladji *et al.* [38].

Tab. 4.9: Résultats de criblage des différents extraits (feuilles de *M. arvensis*)

Phytocomposés	Extraits							
	Et ₂ O	CHCl ₃	AcOEt	MeOH	Eau	EtOH	Eau	Et ₂ O
Acides gras	nt	nt	nt	nt	nt			+
Alcaloïdes	+	-	-	+	+	-		-
Anthocyanosides	-	-	-	-	-	-		
Anthracenosides	nt	nt	nt	nt	nt	+		nt
Cardinolides	-	-	-	-	+			
Composés réducteurs	-	-	-	-	-	+		
Coumarines	nt	nt	nt	nt	nt	+		
Flavonoïdes	-	+	+	+	+	+		
Huiles essentielles	+				+			+
Saponosides	-	-	-	-	+		-	
Stéroïdes					-			
Sterols et terpènes	+	+	+	-	-	-		
Tanins	-	+	+	+	+	+	+	

+: presence, -: absence, nt: non testé

3.2. Résultats d'extraction à partir de *M. arvensis*

1^{er} protocole: L'opération de la macération a été répétée trois fois pour augmenter la masse de l'extrait.

Tab.4.10: rendement d'extraction

Masse de la matière végétale	Extrait	Aspect-couleur	Masse(g)	Rdt (%)
100g	Hexane	Liquide vert	1,23	1,23
	Chloroforme	Liquide marron	1,18	1,18
	Acetate d'éthyle	Liquide jaune	1,31	1,31

Les extraits obtenus sont analysés par la chromatographie sur couche mince (CCM). Pour l'élution, nous avons procédé à plusieurs systèmes, avec différentes proportions, pour en obtenir le meilleur entre eux. L'observation a été faite sous lampe d'UV (254 et 365); nous avons aussi déterminé le rapport frontal (R_f) pour chaque composé.

Tab. 4.11: Résultats d'analyse par CCM (extrait d'acétate d'éthyle)

Eluant	Spots: R_f (Couleur)
(CHCl ₃ /MeOH) (5/5)	0.34 (jaune), 0.38 (sombre), 0.48 (sombre), 0.59 (sombre), 0.75 (sombre), 0.87 (sombre)
(CHCl ₃ /MeOH) (8/2)	0.10 (Jaune) , 0.18 (sombre), 0.32 (sombre), 0.50 (sombre), 0.62 (sombre), 0.73 (sombre)
(CH ₂ Cl ₂ /MeOH) (8/2)	0.11 (sombre), 0.32 (sombre), 0.57 (sombre), 0.71 (sombre), 0.84 (sombre)
(AcOEt/ BuOH) (1/9)	0.10 (Jaune), 0.13(sombre), 0.20(sombre), 0.27 (sombre), 0.47 (sombre)
(AcOEt/ MeOH)(6/4)	0.28 (sombre), 0.40 (sombre)

Tab.4.12: Résultats d'analyse par CCM (extrait chloroformique)

Eluant	Spots: R_f (Couleur)
(CHCl ₃ / MeOH) (5/5)	0.12 (sombre), 0.26 (sombre), 0.48 (sombre), 0.66 (Vert)
(CHCl ₃ / MeOH) (9/1)	0.30 (Vert)
(BuOH/ C ₂ H ₄ O ₂) (9/1)	0.53 (sombre)
(CH ₂ Cl ₂ / MeOH)(8/2)	0.22 (sombre), 0.37 (sombre), 0.44 (sombre), 0.81 (Vert)
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (7/2/1)	0.45 (sombre), 0.67 (sombre), 0.93 (sombre)

Tab.4.13: Résultats d'analyse par CCM (extrait hexanique)

Eluant	Spots: R_f (Couleur)
(CHCl ₃ / MeOH) (8/2)	0.18 (Jaune) 0.58 (sombre) 0.76 (sombre) 0.90 (sombre)
(BAW) (4/4/2)	0.61 (sombre)
(AcOEt/hexane/ MeOH) (4/4/2)	0.17 (sombre) 0.68 (sombre)
(Cyclohexane / BuOH) (5/5)	0.22 (Jaune) 0.30 (sombre) 0.72(sombre) 0.89 (sombre)
(CHCl ₃ /MeOH/CH ₂ Cl ₂) (8/1/1)	0.41 (sombre) 0.91 (sombre)

Pour la séparation par chromatographie sur colonne, on a utilisé (CH₂Cl₂/MeOH) comme phase mobile pour l'extrait d'acétate d'éthyle et on a choisit le système: (CHCl₃/MeOH) pour les extraits (hexanique et chloroformique).

****Stratégie de séparation:**

a/Extrait chloroformique: Quatre (4) grammes de l'extrait chloroformique sont séparés par chromatographie sur une colonne de gel de silice, l'élution est faite initialement au moyen d'un mélange de solvants : Dichloromethane/Methanol 95/5, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, /60/40, 50/50, 40/60, et 20/80. Les fractions de 50 ml recueillies à chaque fois, sont soumises à une CCM. Après séchage des plaques, ces dernières sont examinées sous la lumière UV à 254 et 366 nm et révélées par l'iode quand il est nécessaire. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

Tab.4.14: Fractionnement de l'extrait chloroformique

fractions	Eluant (CH ₂ Cl ₂ /MeOH)	Examen CCM
1-8	100/0	Néant
9-16	95/5	Une tache
17-25	95/5	"
26-30	85/15	Deux taches
31-40	"	"
41-60	80/20	Une petite tache
61-80	80/20	"
81-120	80/20	Deux taches voisines
121-126	"	Deux taches+traînée
127-150	75/25	traînée
151-169	"	"
170-190	"	"
191-213	70/30	Traînée
214-242	"	"
243-260	"	"
261-286	"	"
287-320	65/35	Une tache +traînée
321-358	"	"
359-376	"	"
377-400	60/40	Traînée
401-422	"	2 taches+traînée
423-444	50/50	Traînée
445-468	"	"
469-483	"	"
484-500	40/60	Néant
500-518	20/80	"

Ces différentes fractions récupérées subissent une CCM, puis examinées sous la lumière UV; les fractions qui possèdent des similitudes sont réunies en 10 lots.

Tab.4.15 : Rassemblement des fractions
de l'extrait chloroformique

Lots	Fractions	Poids (mg)	Examen CCM
1	1-8	/	Néant
2	9-25	290	Une tache rose
3	26-40	150,3	Trois tache +traînée
4	41-80	190	traînée
5	81-190	100,1	Trois tâches noires
6	191-213	100,3	Traînée
7	214-286	117,3	traînée
8	287-376	56,0	2 taches+traînée
9	377-422	173	2 petites taches
10	423-483	23,2	traînée

-*Purification*: Les lots, qui nous semblent intéressants, sont examinés par CCM. Les systèmes d'éluion utilisés sont: éther de pétrole / Acétate d'éthyle et chloroforme / méthanol dans différentes proportions. Le lot n°2 présente une tâche visible, ce qui nous a encouragés à purifier cet extrait.

-*Purification du lot n°2* : La masse de 290 mg est chromatographiée sur colonne de gel de silice. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant:

Tab.4.16: Fractionnements du lot 2 de l'extrait chloroformique

Fractions	Eluant (EP/AcOEt)	Examen CCM
1-12	95/5	Deux petites taches
13-25	90/10	traînée
26-36	85/15	traînée
37-44	80/20	deux taches+traînée
45-73	75/25	Néant
74-88	70/30	deux taches
89-110	70/30	deux taches+traînée

Les fractions similaires sont regroupées en sous lots selon le tableau suivant :

Tab.4.17: Rassemblement des sous lots du lot 2

Sous lot	Fractions	Poids (mg)	Examen CCM
1	1-12	30.1	deux taches +traînée
2	13-36	31.5	Traînée
3	37-44	23.5	Deux taches + traînée
4	45-73	25.5	Néant
5	74-110	23,5	deux taches

Les sous lot 1 et 5 ont abouti à l'isolement des produits Ma_1C_1 , Ma_1C_2 et Ma_1C_3 .

b/ *Extrait d'acétate d'éthyle* : une masse de 3,75 g de l'extrait d'acétate d'éthyle a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice. L'éluion est réalisée au moyen de l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle, puis par un

mélange chloroforme-méthanol. On termine la chromatographie avec le méthanol pur.

Les 300 fractions ont été collectées, et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques examinées à la lumière UV (254, 365nm) Les résultats de ce traitement sont résumés dans le tableau suivant :

Tab.4.18: Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle

Fractions	Eluant (EP/AcOEt)	Examen CCM
1_4	100/0	Traînée
5_24	–	Traînée + Tâche
24_44	–	Tâche + Traînée
45_50	90/10	Néant
51_56	–	Néant
57_63		Traînée
64_74	–	Tâche + Traînée
75_80	80/20	Tache majoritaire +Traînée
81_90	–	Néant
90_114	70/30	Tâche
115_123	60_40	Petite tache
124_130	–	Petite tache
131_137	65/35	Néant
138_144	–	Néant
145_155	50/50	traînée
156_164	40/60	Traînée
165_177	–	Traînée
178_184	30/70	Traînée
185_199	80/20	Traînée
200_224	85/15	Traînée
225_250	90/10	Traînée
251_259	0/100	Tache majoritaire + Traînée
	(MeOH/CHCl ₃)	
260_275	50/50	Traînée + Tâche
276_280	80/20	Tache + Traînée
281_300	100/0	Néant

Les fractions sont étudiées sur des plaques de chromatographie sur couche mince, on utilise le système d'éluant (Ether de pétrole /Acétate D'éthyle), examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode. Les fractions de cette colonne qui présentent des similitudes sont réunies en 12 lots.

Tab.4.19: Rassemblement des fractions de l'extrait d'acétate d'éthyle

Lots	Fractions	Poids (mg)	Examen CCM
1	16-4	0.63	Traînée
2	5-44	29.6	Tâche + Traînée
3	45-56	00	Néant
4	57-74	360.01	Tâche +Traînée
5	75-80	20.00	Tache majoritaire
6	81_90	00	Néant
7	90-130	39.8	Tache
8	131-144	0.00	Néant
9	145-250	200.37	Traînée
10	251-259	29.13	Tache majoritaire + Traînée
11	260-280	1.39	Tache + Traînée
12	281-300	0.00	Néant

Le fractionnement des lots 5,7et 10 a abouti à l'isolement des composés **Ma₁Ac₁**, **Ma₁Ac₂** et **Ma₁Ac₃**

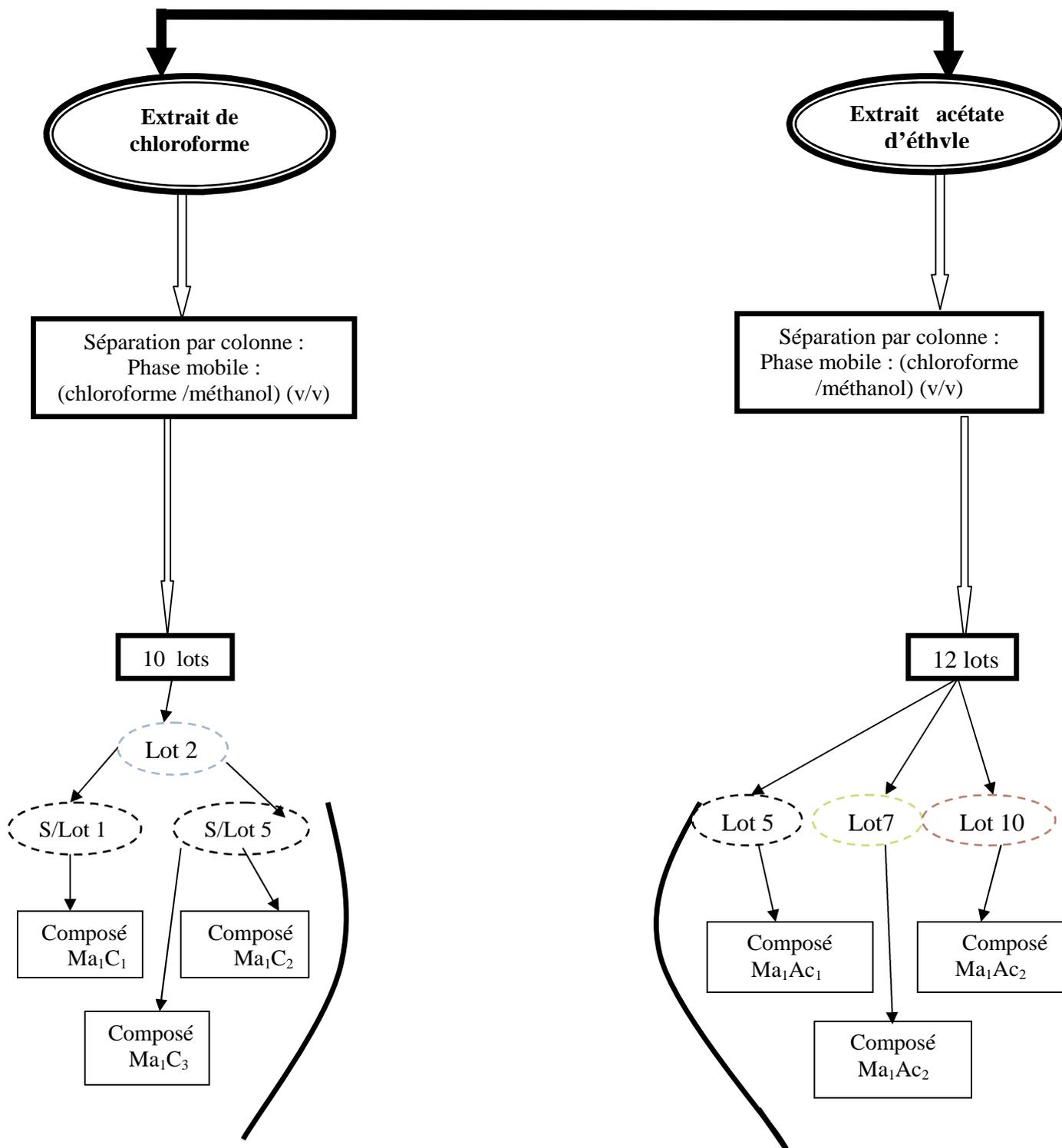


Schéma 4.5: Organigramme récapitulatif des étapes de séparation (*M.arvensis* 1^{er} protocole)

2^{ème} protocole: On a répété l'opération d'extraction deux fois pour augmenter la masse des extraits.

Tab.4.20: Résultat d'extraction

Masse de la matière végétale	Extrait	Aspect-couleur	Masse (g)	Rdt(%)
150g	Ether diéthylique	Liquide vert clair	2,8	1,86
	Acétate d'éthyle	Liquide jaune clair	2,85	1,9
	Butanol	Liquide marron	5,1	3,4

****Résultats d'analyse par CCM:** Les analyses par CCM, en utilisant plusieurs solvants avec différentes proportions, nous ont permis de trouver les résultats suivants:

Tab. 4.21 : Résultats d'analyse par CCM (extrait d'acétate d'éthyle)

Eluant	Spots: R _f (couleur)
(CHCl ₃ /MeOH) (7/3)	0.29, 0.36(violet), 0.41, 0.81
(CHCl ₃ /MeOH) (8/2)	0.35, 0.47, 0.56, 0.60
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (5/2/1)	0.40, 0.45 (jaune), 0.60 (jaune)
(Acétone/toluène/Acide formique) (6/7/1)	0.53(bleu), 0.54, 0.82
(C ₃ H ₆ O /toluène/HCOOH) (6/8/1)	0.52 (violet), 0.55 (violet), 0.80 (violet), 0.81 (violet)
(MeOH/CH ₂ Cl ₂) (6/4)	0.90(jaune)
(AcOEt/C ₆ H ₁₄) (7/3)	0.60, 0.75(jaune)

Tab.4.22 : Résultats d'analyse par CCM (extrait de butanol)

Eluant	Spots: R _f (couleur)
(CHCl ₃ /MeOH) (7/3)	0.60 bleu
(CHCl ₃ /MeOH) (6/4)	0.40, 0.52, 0.55 (violet), 0.56 (violet), 0.86, 0.88 (violet)
(CHCl ₃ /MeOH) (5/5)	0.25, 0.45 (bleu), 0.54 (Rouge), 0.66 (orange)
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (5/2/1)	0.40, 0.45, 0.60
(C ₃ H ₆ O /HCOOH/H ₂ O) (6/1/1)	0.45 (Bleu), 0.63 (bleu), 0.80, 0.90 (violet)
(MeOH/CH ₂ Cl ₂) (5/5)	0.22, 0.44
(AcOEt/Hexane) (9/1)	0.72

Tab.4.23: Résultats d'analyse par CCM (extrait ether diéthylique)

Eluant	Spots: R _f (couleur)
(CHCl ₃ /MeOH) (7/3)	0.29, 0.36, 0.41, 0.81 (violet)
(CHCl ₃ /AcOEt/Acide.formique) (5/4/1)	0.72, 0.81(rose), 0.85 (rose)
(BuOH/CH ₃ COOH) (5/5)	0.62 (vert), 0.80 (jaune), 0.99 (vert)
(MeOH / CH ₂ Cl ₂) (6/4)	0.99 (vert)
(AcOEt/Hexane) (7/3)	0.29, 0.47 (jaune), 0.78 (jaune)

Après ces résultats, on s'est intéressé par les trois extraits (butanolique, acéto-éthylique et ethero-diéthylique). On leur a fait la séparation par colonne chromatographique.

** Stratégie de séparation:

a/ *Extrait d'acétate d'éthyle* : 4,25 g de l'extrait d'acétate d'éthyle ont été mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase et pression normales. L'élution est réalisée au moyen du l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition progressive de

l'acétate d'éthyle, puis par un mélange chloroforme-méthanol. On termine la chromatographie avec le méthanol pur.

Les 310 fractions ont été collectées et analysées par CCM. Les plaques ont été examinées à la lumière UV(254, 365mm). Les résultats de ce traitement sont résumés dans le tableau suivant :

Tab.4.24: Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle

Fractions	Eluant (Ep/AcOEt)	Examen CCM
1_8	100/0	Traînée
9_24	–	Traînée + Tâche
25_44	–	Tâche + Traînée
45_50	90/10	Néant
51_60	–	Néant
61_63		Traînée
64_74	–	Tâche + Traînée
75_80	80/20	Tache majoritaire +Traînée
81_95	–	Néant
90_114	70/30	Tâche
115_120	60/40	Petite tache
121_130	–	Petite tache
131_137	65/35	Néant
138_146	–	Néant
147_155	50/50	Traînée
156_164	40/60	Traînée
165_180	–	Traînée
181_184	30/70	Traînée
185_199	80/20	Traînée
200_224	85/15	Traînée
225_256	90/10	Traînée
257_270	100/0	Tache majoritaire + Traînée
	MeOH/CHCl₃	
271_277	50/50	Traînée + Tâche
278_290	80/20	Tache + Traînée
291_310	100/0	Néant

Les fractions sont étudiées sur des plaques CCM ; on a utilisé le système d'éluant (CHCl₃ /AcOEt), examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode. Les fractions de cette colonne qui présentent des similitudes sont réunies en 14 lots.

Tab.4.25 : Rassemblement des fractions de l'extrait d'acétate d'éthyle

Lots	Fractions	Masse (mg)	Examen CCM
1	1-8	1.63	Traînée
2	9-44	20.2	Traînée + Tâche
3	45_60	0.00	Néant
4	61_74	107.76	Traînée
5	75_80	20.00	Tache majoritaire +Traînée
6	81_95	0.00	Néant
7	96_130	24.13	Petite tache
8	131_146	0.00	Néant
9	147_155	30.52	Traînée
10	156_180	200.37	Traînée
11	181_256	29.13	Traînée
12	257_270	179.09	Tache majoritaire + Traînée
13	271_290	1.39	Tache + Traînée
14	291_310	0.00	Néant

Le fractionnement et le sous-fractionnement des lots 5, 7 et 12 ont abouti à l'isolement des composés **Ma₂Ac₁**, **Ma₂Ac₂** et **Ma₂Ac₃**.

b/ *Extrait butanolique* : 2,52g de l'extrait butanolique ont été soumis à fractionner par une chromatographie sur colonne remplie par 70 g du gel de silice. L'élution a été effectuée au moyen des différents gradients de l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol pur. Les 100 fractions obtenues (chacune après 10s), sont analysées par CCM. Les résultats de ce traitement sont résumés dans le tableau suivant.

Tab.4.26: Fractionnement de l'extrait butanolique

Fractions	Eluant (Hexane /AcOEt/ MeOH)	Examen CCM
1_4	100/0/0	Petite tache
5_9	100/0/0	Petite tache
9_13	90 /10/0	Petite tache
14_20	90 /1/00	Néant
21_27	80/20/0	Néant
28_32	80/20/0	Néant
33_36	70/30/0	Petite tache
37_44	70/3/0	Petite tache
45_49	60/40/0	Petite tache
50_58	60/40/0	Petite tache
59_63	50/50/0	Néant
64_75	40/60/0	Néant
76_80	30 /70/0	Néant
81_88	20/80/0	Néant
89_95	90/10/0	Néant
96_100	0/0/100	Traînée

Les fractions de cette colonne qui présentent des similitudes sont réunies en 4 lots. Ces derniers sont analysés par CCM en utilisant le système d'éluant (Hexane /Acétate d'éthyle) et la vapeur d'iode comme révélateur.

Tab.4.27: Présentation des lots obtenu à partir d'extrait butanolique

Lots	Fractions	Masse (mg)	Examen CCM
1	1_13	2.25	Petite tache
2	14_32	0.00	Néant
3	33-58	49.75	Petite tache
4	59-100	0.0	Néant

-Le lot n°1 est chromatographié sur une colonne de gel de silice en phase normal (40 g) avec l'éluant chloroforme-méthanol: 100-0 à 0-100. Des fractions de 20 mL ont été récupérées et rassemblées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant chloroforme –méthanol 95-5 et 80-20, pour donner le composé **Ma₂B₁**

-Le lot n°3 purifié sur une colonne de gel de silice en phase normale avec l'éluant CHCl₃-MeOH (80-20), a abouti à l'isolement du composé **Ma₂B₂**.

c/ *Extrait d'ether diethylique*: 2,83 grammes de l'extrait d'ether diethylique ont été chromatographiés sur une colonne de gel de silice (90g), l'élution est faite initialement au moyen d'un mélange de solvants : éther de pétrole/acétate d'éthyle 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, et 20/80.

Tab.4.28: Fractionnement de l'extrait ether diethylique

fraction	Eluant (EP/AcOEt)	Examen CCM
1-5	90/10	Néant
6-10	90/10	Néant
11-15	90/10	Une tache
16-26	80/20	"
27-34	80/20	Deux taches
35-48	80/20	"
49-70	70/30	Une petite tache
71-80	70/30	"
81-100	70/30	Deux taches voisines
101-126	60/40	Deux taches+traînée
127-152	60/40	Traînée
153-167	60/40	"
168-192	60/40	"
193-210	50/50	"
211-243	50/50	"
244-260	50/50	"
261-280	50/50	"
281-300	40/60	Une tache+traînée
301-320	40/60	"
321-336	40/60	"
337-356	20/80	Traînée

Les fractions recueillies, sont soumises à une chromatographie sur couche mince. Les plaques sont examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessus (Tab.4.28).

Les différentes fractions récupérées subissent une CCM, puis examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode; les fractions qui possèdent des similitudes sont réunies en 9 lots.

Tab.4.29: *Rassemblement des fractions de l'extrait ethero-diéthylique*

Lots	Fractions	Masse (mg)	Examen CCM
1	1-10	/	Néant
2	11-26	215	Une tache rose
3	27-48	150	Trois tache +traînée
4	49-80	180,5	Mélange
5	81-126	105,2	Trois tâches
6	127-210	54,8	"
7	211-280	100,1	Traînée
8	281-356	48,4	Mélange complexe
9	357-362	105,8	Trois taches+traînée

Les lots, qui nous semblent intéressants, sont analysés par CCM. Le système d'élution utilisé est: chloroforme / méthanol dans différentes proportions. Les lots 2 et 5 nous ont encouragés à les purifier.

-*Purification du lot n°2* : La masse de 215 mg est chromatographié sur colonne de gel de silice (10g). Les résultats de cette colonne sont représentés dans le tableau suivant :

Tab.4.30 : *Fractionnements du lot 2 de l'extrait ether diéthylique*

Fractions	Eluant (EP/AcOEt)	Observation en CCM
1-5	90/10	Néant
6-14	90/10	Deux petites taches
15-29	80/20	Traînée
30-36	80/20	Mélange
37-40	80/20	Deux taches+traînée
41-60	70/30	Néant
61-70	70/30	Néant
71-80	60/40	Deux taches
81-100	60/40	Deux taches+traînée

Les fractions similaires sont regroupées en sous lots selon le tableau suivant:

Tab. 4.31: *Rassemblement des sous lots du lot n°2*

Sous lot	Fractions	Examen CCM
1	1-5	Néant
2	6-29	Deux taches +traînée
3	30-36	Traînée
4	37-40	Deux taches
5	41-70	Néant
6	71-100	Deux taches

Le sous lot n°4 a abouti à l'isolement de produit **Ma₂E₁**

-Purification du lot n°5: La masse de 105,2 mg est chromatographiée sur colonne de gel de silice(10g). Les résultats de cette colonne sont représentés dans le tableau suivant:

Tab.4.31_a: Fractionnements du lot 5 de l'extrait ether diethylique

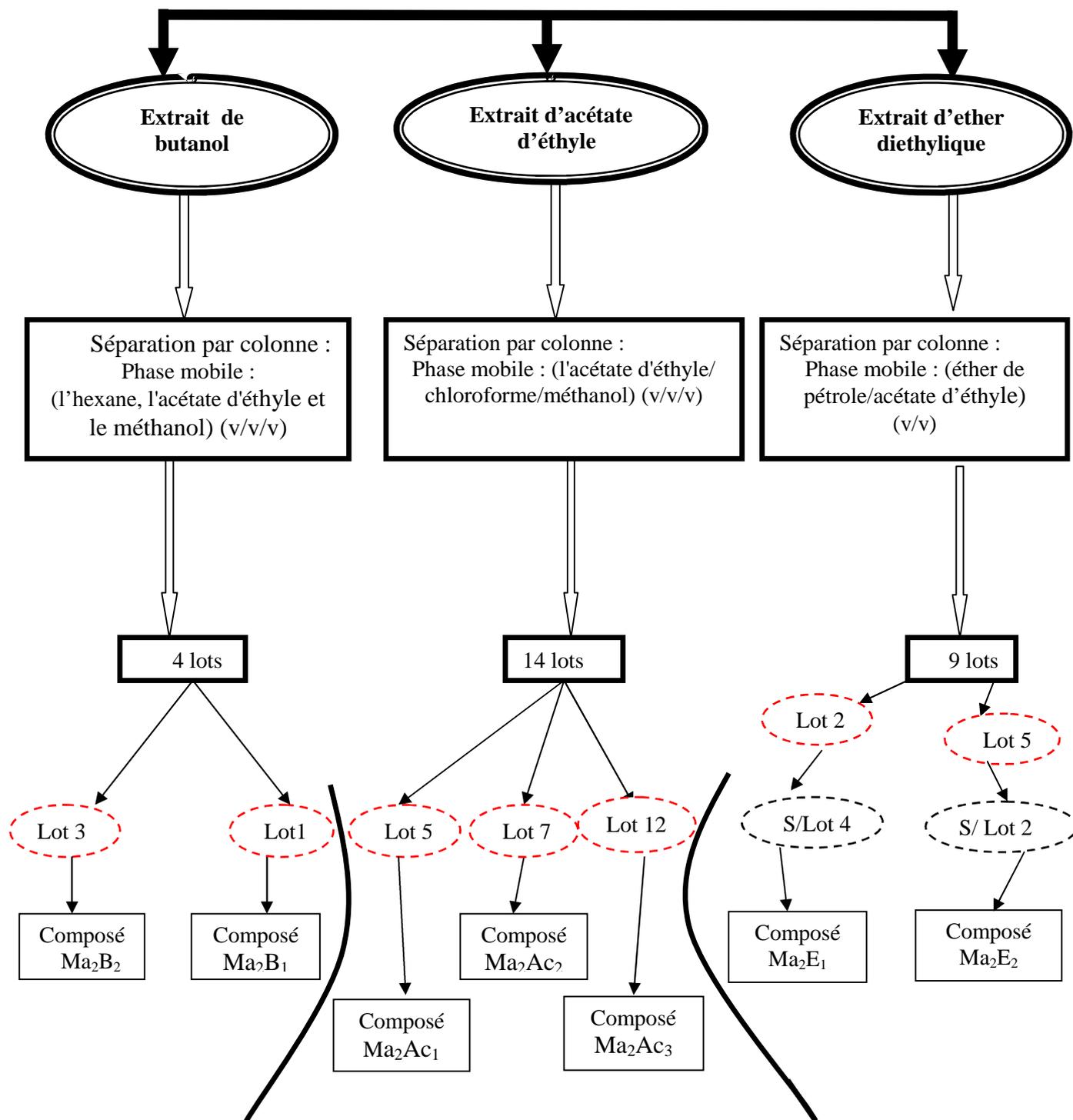
Fractions	Eluant (EP/AcOEt)	Observation en CCM
1-8	90/10	Néant
9-15	90/10	Deux petites taches
16-26	80/20	Traînée
27-37	80/20	Mélange
38-45	80/20	Deux taches+traînée
46-60	70/30	Néant
61-72	70/30	Néant
73-82	60/40	Deux taches
83-96	60/40	Deux taches+traînée

Les fractions similaires sont regroupées en sous lots selon le tableau suivant:

Tabl. 4.32: Rassemblement des sous lots du lot n°5

Sous lots	Fractions	Examen CCM
1	1-8	Néant
2	9-15	Deux taches
3	16-45	Traînée
4	46-72	Néant
5	73-82	Deux taches
6	83-96	Deux taches+traînée

Le sous lot n°2 a abouti à l'isolement de produit **Ma₂E₂**



Schema 4.6 : Organigramme récapitulatif des étapes de séparation (*M. arvensis* 2ème protocole)

3.3. Resultats d'extraction à partir de *Z. macroptera*

1^{er} protocole: On a répété l'opération d'extraction deux fois pour augmenter la masse des extraits. On a remarqué que le butanol a le plus grand rendement.

Tab.4.33: Rendements d'extraction

Masse de la matière végétale	Extrait	Aspect-couleur	Masse (g)	Rdt(%)
170g	Chloroforme	Liquide vert clair	1.7	1
	Acetate d'éthyle	Liquide jaune clair	2.3	1.35
	Butanol	Liquide marron	5.16	3.03

****Resultats d'analyses par CCM:** Les analyses par CCM, en utilisant plusieurs solvants avec différentes proportions, nous ont permis de trouver les résultats suivants:

Tab.4.34: Résultats CCM (extrait Chloroforme)

Eluant	UV (254 nm)	UV (365 nm)
MeOH/H ₂ O (9/1)	1tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (6/4)	1tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (8/2)	1 grande tache	1tache floue
MeOH/CHCl ₃ (7/3)	1 grande tache	1tache floue
MeOH/CHCl ₃ (5/5)	mélange	1 spot mauve
MeOH/CHCl ₃ (4/6)	1 spot + trainé	1 spot + trainé
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (4/1/1)	4 spots	2 spots mauves
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (5/4/1)	trainé	trainé
CHCl ₃ /Acetone (7/3)	neant	neant
CHCl ₃ / Hexane/MeOH (10/4/1)	11 spots	
CHCl ₃ / Hexane/ MeOH (10/4/0.5)	11 spots	
CHCl ₃ /Acétone (4/1)	Néant	

Tab.4.35: Résultats CCM (Extrait d'AcoEt)

Eluant	UV (254 nm)	UV (365 nm)
MeOH/Eau (9/1)	1tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (6/4)	1tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (8/2)	1 grande tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (7/3)	1 tache	1tache mauve
MeOH/CHCl ₃ (5/5)	1 tache mélangée	1 spot mauve
MeOH/CHCl ₃ (4/6)	1tache	1tache
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (4/1/1)	1tche	1tache mauve
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (5/4/1)	mélange	mélange
CHCl ₃ /Acetone (7/3)	neant	neant
Ep/AcoEt (5/5)	neant	neant
CHCl ₃ / MeOH (10/1)	4 spots	
CHCl ₃ / Hexane/ MeOH (10/4/1)	6 spots	

Tab.4.36: Résultats CCM (Extrait butanolique)

Eluant	UV (254 nm)	UV (365 nm)
MeOH/CHCl ₃ (8/2)	Neant	Neant
MeOH/CHCl ₃ (7/3)	3 taches	1grnde tache
MeOH/CHCl ₃ (5/5)	1 tache mélangée	Neant
MeOH/CHCl ₃ (4/6)	4spots clairs	Neant
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (4/1/1)	4 spots	3spots mauves
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (5/4/1)	5spots	4 spots mauves
MeOH/CHCl ₃ (9/1)	2spots	1spot mauve
(BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O) (5/2/1)	4 spots	3 spots
CHCl ₃ / MeOH (10/1)	1 spot	
BuOH / Acétone(5/5)	trainé	
Ether di éthylique/ Acétone(4/1)	4 spots	

****Stratégie de séparation**

a/ *Extrait de butanol* : 3.16 g de l'extrait butanolique ont été soumis à fractionner par une chromatographie sur colonne remplie par 90 g du gel de silice. L'élution a été effectuée au moyen des différents gradients de l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol pur.

Les 140 fractions obtenues (chacune après 10s), sont analysées par CCM. Les fractions qui présentent des similitudes sont réunies en 15 lots. Ces derniers sont analysés par CCM en utilisant le système d'éluant (Hexane /AcOEt/ MeOH) et la vapeur d'iode comme révélateur.

Tab.4.37 : Rassemblement des fractions de l'extrait butanolique

lots	fractions	Eluant (Hexane/AcoEt/MeOH)	Examen CCM
1	1-9	100/0/0	Néant
2	10-19	100/0/0	Tainée
3	20-34	60/ 40/0	Mélange complexe
4	35-43	60/40/0	Taches + trainée
5	44-53	20/60/20	Néant
6	54-63	0/ 60/40	Mélange
7	64-91	0/ 20/80	Grande tache
8	92-98	0/ 20/80	Mélange séparable
9	99-105	0/ 20/80	Néant
10	106-109	0/10/90	Tache + trainée
11	110-115	0/10/90	Tainée
12	116-119	0/10/90	Néant
13	120-125	0/10/90	Néant
14	126-129	0/0/100	Néant
15	130-140	0/0/100	Néant

Purification du lot n°8: Le lot 8 (13,6 mg) est chromatographié sur une colonne de gel de silice en phase normale (4 g) avec l'éluant chloroforme-méthanol. Les résultats de cette colonne sont représentés dans le tableau suivant:

Tab.4.38 : Fractionnements du lot 8 de l'extrait butanolique

Sous lots	Fractions	Éluant (CHCl ₃ /MeOH)	Examen CCM
1	1-9	95/5	Néant
2	10-17	95/5	Deux petites taches+traînée
3	18-29	90/10	Tainée
4	30-38	85/15	Tainée
5	39-48	80/20	Deux taches
6	49-60	70/30	Néant
7	61-70	70/30	Néant

Des fractions de 20 ml ont été récupérées et rassemblées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant chloroforme /méthanol 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30 et 80/20. Le traitement du sous lot 5 a abouti à l'isolement du composé **Zm₁B₁**.

b/ Extrait d'AcOEt: 2, 3 g de l'extrait d'acétate d'éthyle a été mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice(100g), en phase et pression normales. L'élution est réalisée au moyen du mélange chloroforme-méthanol.En fin la séparation est achevée par l'utilisation du méthanol pur. Les 100 fractions sont étudiées sur des plaques CCM ; on a utilisé le système d'éluant (CHCl₃ / MeOH). Les plaques sont examinées sous la lumière UV à 254 et 365nm et révélées par la vapeur d'iode. Les fractions de cette colonne qui présentent des similitudes sont réunies en 9 lots.

Tab. 4.39: Rassemblement des fractions de l'extrait d'acetate d'éthyle

Lots	Fractions	Éluant CHCl ₃ /MeOH	Examen CCM
1	1-19	100/0	Traînée
2	20-35	80/ 20	Traînée + Tâche
3	36-45	80/20	Néant
4	46-56	50/50	Tache majoritaire + Traînée
5	57-61	50/50	Traînée
6	62-76	20/80	Néant
7	77-80	20/80	Petite tache
8	81-90	0/100	Néant
9	91-100	0/100	Traînée

Le fractionnement et le sous-fractionnement des lots 4 et 7 ont abouti à l'isolement des composés **Zm₁Ac₁**, **Zm₁Ac₂** et **Zm₁Ac₃**.

c/ Extrait chloroformique: Deux grammes (2g) de l'extrait chloroformique sont traités par chromatographie sur une colonne de gel de silice(100g), l'élution est faite initialement au moyen d'un mélange de solvants : éther de pétrole/acétate d'éthyle 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50,

40/60, 30/70, 10/90 et 5/95. Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

Tabl.4.40: Fractionnement de l'extrait chloroformique

fraction	Eluant (EP/AcOEt)	Examen CCM
1-9	90/10	Néant
10-18	"	Néant
19-24	"	Une tache
25-36	80/20	"
37-44	"	Deux taches
45-56	"	"
57-70	80/20	Une petite tache
71-84	80/20	"
85-100	80/20	Deux taches voisines
101-126	"	Deux taches+traînée
127-142	70/30	Traînée
143-160	"	"
161-170	"	"
171-200	60/40	"
201-240	"	"
241-260	50/50	"
261-281	40/60	"
282-328	40/60	Une tache +traînée
336-358	30/70	"
359-406	"	"
407-415	10/90	Traînée
416-422	5/95	2 taches+traînée
423-430	5/95	Neant

Ces différentes fractions récupérées subissent une chromatographie sur CCM, puis examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode; les fractions qui possèdent des similitudes sont réunies en 11 lots (Tab.4.41).

Les lots 2, 4 et 10 nous ont semblé intéressants; ils sont examinés par CCM. Les systèmes d'éluion utilisés sont : éther de pétrole / Acétate d'éthyle et chloroforme / méthanol dans différentes proportions. Le traitement du lot 2 nous a permis d'isoler le composé **Zm₁C₁**.

Tab.4.41: Rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique

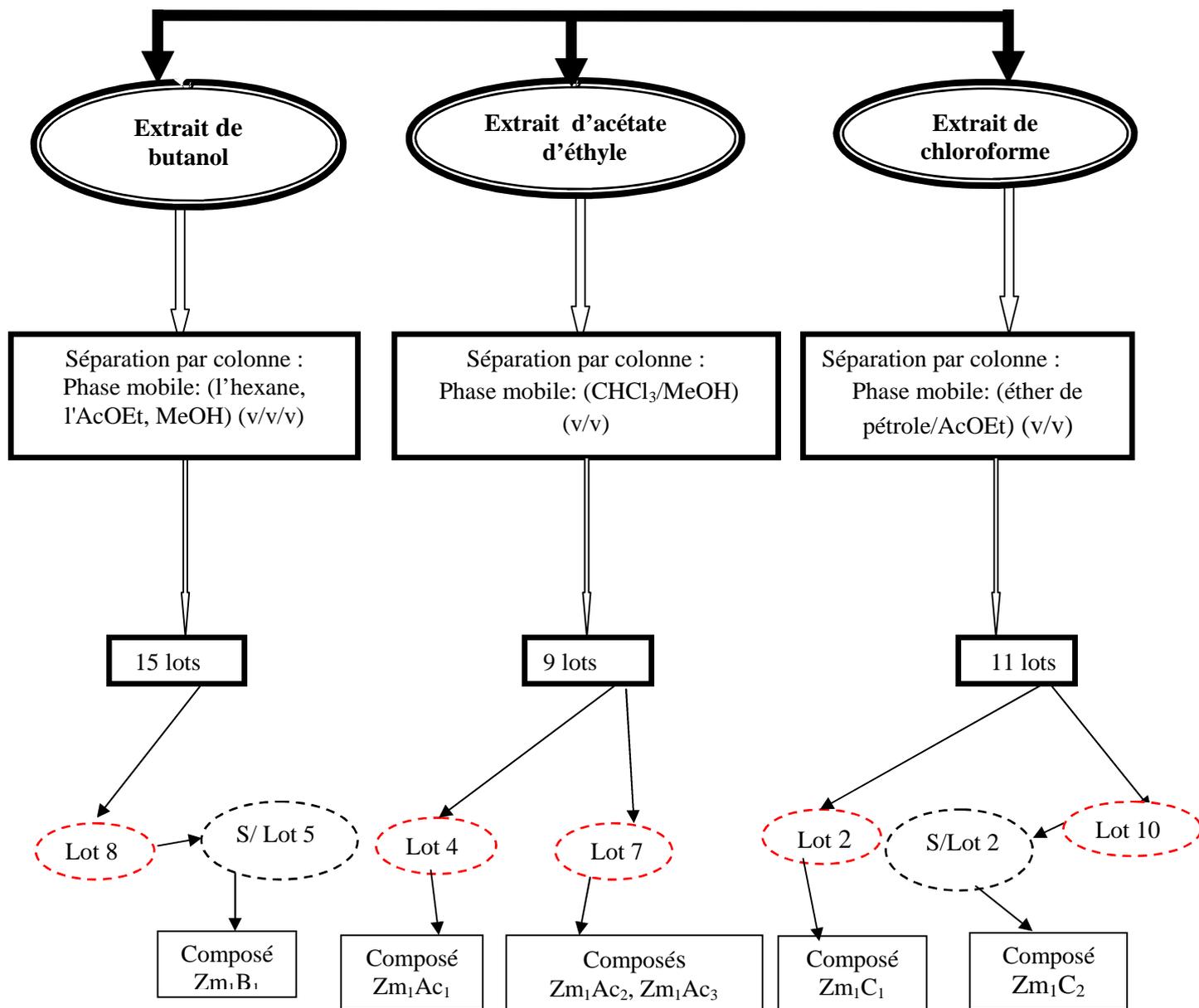
Lots	Fractions	Masse (mg)	observations
1	1-18	/	Néant
2	19-36	211	Une tache
3	37-56	150	Trois tache +traînée
4	57-84	120,5	Petite tache
5	85-126	110	Deux tâches
6	127-170	57,5	Mélange
7	171-281	99,1	Mélange complexe
8	182-406	118,1	tache+traînée
9	407-415	132,7	Traînée
10	416-422	56,4	Deux petites tâches+ Traînée
11	423-430	/	Neant

Purification du lot n°10 : La masse de 56 mg est chromatographiée sur colonne de gel de silice(10g). Les résultats de cette colonne sont représentés dans le tableau suivant :

Tab.4.42: Fractionnements du lot 10 de l'extrait chloroformique

Fraction	Eluant (CHCl ₃ /MeOH)	Examen CCM
1-6	90/10	Néant
7-12	90/10	Deux petites taches
13-25	85/15	Traînée
26-36	80/20	Mélange
37-43	75/25	Deux taches+traînée
44-52	75/25	Néant
53-70	70/30	Néant

Les fractions similaires sont regroupées en sous lots. Le sous lot n°2 (7-12) du lot 10 a été soumis à une chromatographie sur colonne (CC), l'éluant étant CHCl₃ /MeOH (80/20), d'où on a pu isoler le produit **Zm₁C₂**.



Schema 4.7 : Organigramme récapitulatif des étapes de séparation
(*Z.macroptera* 1er protocole)

2^{ème} protocole: l'opération d'extraction a été répétée trois fois pour augmenter la masse des extraits.

Tab.4.43: Résultats d'extraction

Masse de la matière végétale	extrait	Aspect-couleur	Masse (g)	Rdt (%)
60g	Ether diéthylique	Liquide vert clair	1.22	2.03
	Acétate d'éthyle	Liquide jaune clair	1.30	2.16
	Butanol	Liquide marron	2.12	3.53

****Résultats d'analyses par CCM:** Les analyses par CCM, en utilisant plusieurs solvants avec différentes proportions, nous ont permis de trouver les résultats suivants:

Tab. 4.44: Résultats CCM (Extrait d'Ether di éthylique)

Eluant	Examen CCM
CHCl ₃ / MeOH (9/1)	7 spots
CHCl ₃ / C ₆ H ₁₄ /MeOH (10/4/1)	11 spots
CHCl ₃ / C ₆ H ₁₄ / MeOH (10/4/0.5)	11 spots
CHCl ₃ / Acétone (4/1)	Trainée
CHCl ₃ / Acétone (7/3)	7 spots

Tab. 4.45: Résultats CCM (Extrait d'AcOEt)

Eluant	Examen CCM
CHCl ₃	Néant
CHCl ₃ / MeOH (10/1)	2 spots:0.10, 0.94
CHCl ₃ /MeOH (9/1)	7spots:0.27; 0.35, 0.45, 0.54, 0.68, 0.87
CHCl ₃ /MeOH (8.5/1.5)	Néant
CHCl ₃ / Hexane/MeOH(10/4/1)	4 spots: 0.43, 0.47, 0.52, 0.56
MeOH 100%	Néant
BuOH /Acétone(5/5)	Néant
AcOEt/ Acétone(1/1)	Néant
Ether diéthylique/ Acétone(4/1)	4 spots:0.23, 0.30, 0.4, 0.5
CHCl ₃ /(CH ₃) ₂ CO (7/3)	7spots:0.18, 0.35, 0.60, 0.72, 0.85, 0.87
Ether de pétrole /AcOEt (6/4)	1 spot: 0.987
AcOEt /MeOH/Eau (5/2/1)	3 spots:0.546 0.616 0.732
CHCl ₃ /MeOH (8/2)	7 spots: 0.11 0.26 0.45 0.52 0.60 0.75 0.962
CHCl ₃ /MeOH (7/3)	4 spots: 0.11 0.7 0.8 0.92
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (4/1/1)	5 spots: 0.35, 0.47, 0.6, 0.68, 0.98
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (3/1/1)	7 spots: 0.31, 0.37, 0.47, 0.53, 0.6, 0.65, 0.93
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (5/2/1)	7 spots: 0.35 0.43, 0.5, 0.53, 0.62, 0.67, 0.72
BuOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O (5/4/1)	7 spots: 0.66, 0.71, 0.76, 0.81, 0.83, 0.93, 0.97

Tab.4.46: Résultats CCM (Extrait butanolique)

Eluant	Examen CCM
CHCl ₃ / MeOH (9.5/0.5)	4 spots: 0.76, 0.79, 0.81, 0.82
CHCl ₃ / MeOH (9/1)	3spots: 0.10, 0.27, 0.87
CHCl ₃ / MeOH (7/3)	4 spots: 0.05, 0.2, 0.35, 0.6
CHCl ₃ /Hexane/ MeOH (10/4/1)	6 spots: 0.07, 0.17, 0.23, 0.28, 0.35, 0.40
CHCl ₃ /acetone (7/3)	2spots: 0.18, 0.87

****Séparation et purification**

- *Extrait de l'acetate d'ethyle*: 2.30 grammes de l'extrait par l'acetate d'ethyle sont traités par chromatographie sur une colonne de gel de silice(80g), l'élution est faite initialement au moyen d'un mélange de solvants : éther diéthylique/acétate d'éthyle/méthanol: 100/0/0, 80/20/0, 50/50/0, 0/100/0, 0/50/50, 0/0/100. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

Tab. 4.47: *Fractionnement de l' extrait de l'acetate d' ethyle*

Fractions	Éluant (Et ₂ O / AcOEt/ MeOH)	Examen CCM
1-20	100/0/0	Néant
21-40	100/0/0	Spot mauve-rose
41-58	80/20/0	Spot
59-76	80/20/0	Néant
77-80	80/20/0	Spot majoritaire bleu
81-100	50/50/0	Néant
101-105	50/ 50/0	Spot
106-110	0/100/0	Spot
111-115	0/100/0	Spot
116-125	0/100/0	Spot
126-145	0/50/50	Néant
146-170	0/0/100	Néant

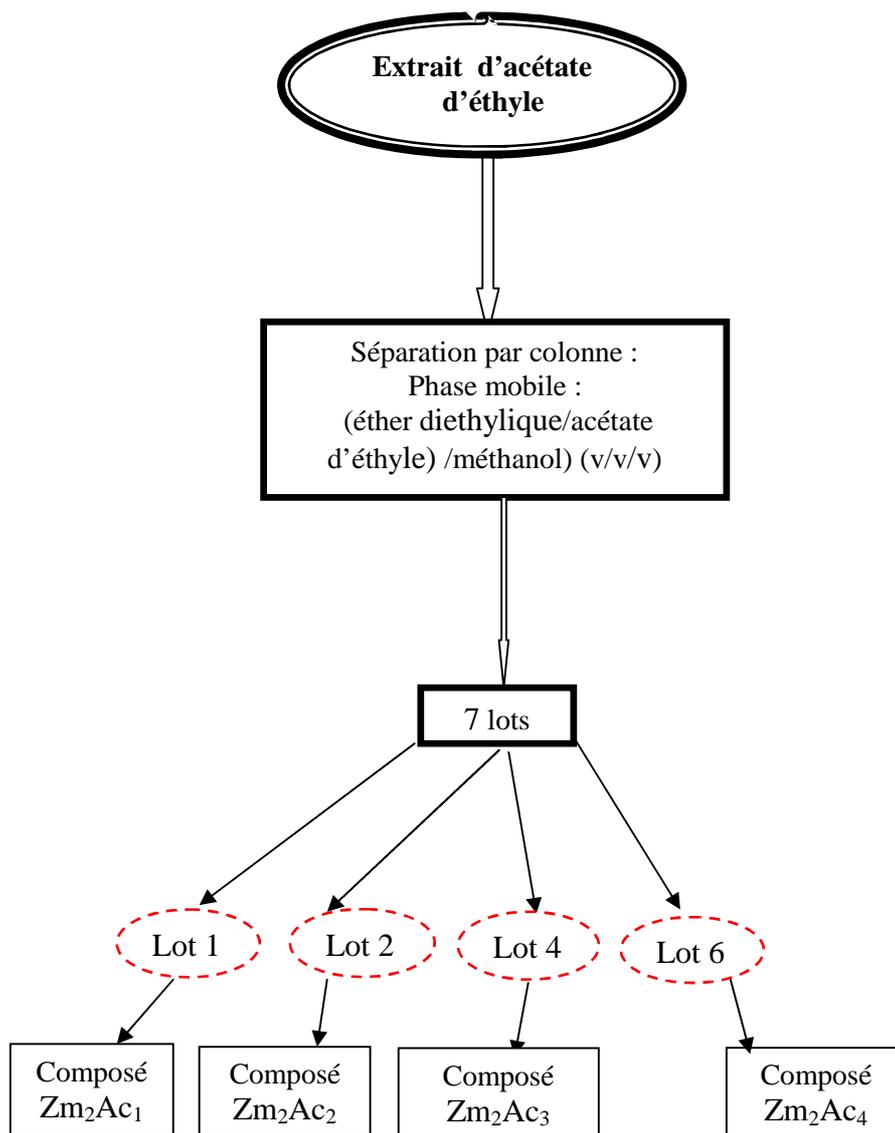
Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant comme système d'élution: CHCl₃/ Hexane (10/4) et CHCl₃/ Hexane/ MeOH (10/4/1); Les plaques sont examinées sous la lumière UV et révélées par la vapeur d'iode; les fractions qui possèdent des similitudes sont réunies en 7 lots.

Tab.4.48: *Rassemblement des fractions*

N° de lots	fractions	Éluant (Et ₂ O/ AcoEt/ MeOH)	Examen CCM
1	1-40	100/0/0	Tache mauve
2	41-58	80/20/0	Petite tache
3	59-76	80/20/0	Néant
4	77-80	50/50/0	Tache bleue
5	81-100	50/50/0	Néant
6	101-125	0/1000	Petite tache
7	126-170	0/1000	Neant

Les lots n°1, 2, 4 et 6 nous ont semblé intéressants; ils sont examinés par chromatographie sur CCM à double dimension. Les systèmes d'élution utilisés sont : éther de pétrole / Acétate d'éthyle et dichlorométhane / méthanol dans différentes proportions.

Le traitement des quatre lots précédents nous a permis d'isoler les composés **Zm₂Ac₁** **Zm₂Ac₂**, **Zm₂Ac₃** et **Zm₂Ac₄**.



Schema 4.8 : Organigramme récapitulatif des étapes de séparation
(*Z.macroptera* 2eme protocole)

3.4. Analyses des spectres: Remarques générales

3.4.1. Spectres UV: L'interprétation des spectres UV enregistrés dans le méthanol et/ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues pour les flavonoïdes; règles décrites par Jurd *et al.*[39], reprises par Mabry *et al.* [35] et complétées par Voirin[40].

En analysant les spectres, il peut être remarqué que l'introduction d'hydroxyle ou le groupe méthoxy dans la structure de base de flavone a produit sur son spectre d'absorption des différents effets qu'ont été rapportés.

Nous avons comparé quelques flavones avec seulement un groupe hydroxyle à des positions différentes sur un des cycles, nous avons remarqué que l'introduction d'un groupe hydroxyle à toute position implique un effet bathochrome. Donc l'intensité de l'effet bathochrome dépend de la position du groupe hydroxyle sur le cycle.

L'introduction du troisième groupe de l'hydroxyle à la position 6 affecte des déplacements de +10 nm. L'introduction du troisième groupe de l'hydroxyle à la position 8 déplace vers les longueurs d'onde les plus grandes presque +50 nm. Cet effet est considérablement intense et montre que la combinaison des positions 5 et 8 est plus intéressante que toute autre combinaison. On remarque que la position 7 n'a aucune influence sur le changement de l'absorption, et que la position 5 est la seule pour changer la valeur des maximums, pendant que la position 8 rehausse mieux le changement vers la plus longue longueur d'onde que la position 6.

Les spectres UV des flavanones comportent un maximum caractéristique autour de 270- 295 nm [35,41]. D'autre part, le spectre UV des isoflavones présente un maximum caractéristique vers 260 nm [42].

En règle générale l'addition d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'onde), pour une méthylation ou glycosylation des groupements 3, 5 et 4' hydroxylés, un déplacement hypsochrome est noté pour la bande I.

3.4.2. Spectres IR: Les spectres des composés isolés sont enregistrés en pastille KBr, nous consignons l'ensemble des bandes les plus caractéristiques dans le tableau 4.49.

Pour désigner les vibrations localisées, on utilise les symboles suivants:

ν :vibration d'élongation ou de valence

δ :vibration de déformation

-En solution dans un solvant apolaire, on observe une bande fine à 3610 cm^{-1} . Il s'agit de la vibration d'élongation de la liaison O-H libre.

-Pour le composé pur; on observe une bande large entre 3200 cm^{-1} et 3400 cm^{-1} . Il s'agit des liaisons O-H associées par liaison hydrogène intermoléculaire.

Certains composés polyfonctionnels possèdent une liaison hydrogène intramoléculaire (3480cm^{-1}). Ce type de liaison se distingue facilement d'une liaison intermoléculaire. En effet, un tel pic n'est pas affecté lors de la dilution du composé dans un solvant inerte comme CCl_4 [43]. Les vibrations de valence de ($=\text{C-H}$) aromatique se situent entre 3000 et 3100cm^{-1} . Ces bandes sont remarquables dans des composés et sont cachés dans les autres par les bandes larges de l'alcool aromatique associé ; Les liaisons C-H aliphatiques sont présentées dans le spectre IR par des bandes fines et intenses vers les 2934cm^{-1} (vibration de valence asymétriques des CH_3). Les fréquences de vibrations situées entre ($2913\text{-}2929\text{cm}^{-1}$) correspondent aux vibrations de valence asymétriques des CH_2 , les bandes d'absorption à 2853cm^{-1} associées à des vibrations de valence symétriques des CH_2 [44].

Les vibrations qui se trouvent dans le domaine d'absorption entre 1104 à 1275cm^{-1} figurant dans tous les spectres IR des produits représentent le groupement étherique.

Les fréquences de vibrations 930cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation hors plan des hydrocarbures insaturés.

Les vibrations de valence des cétones cycliques à six chaînons ou plus, ou cétones aliphatiques (C=O) se situe vers 1717cm^{-1} de même 1738cm^{-1} et 1717cm^{-1} pour les esters d'alcool vinyliques qui possèdent le fragment ($-\text{CO-O-C=C}$); ce groupe entraîne une augmentation importante de la fréquence de vibration carbonyle (l'acétate de vinyle absorbe à 1776cm^{-1} et l'acétate de phényle absorbe à 1770cm^{-1}) la vibration de déformation en dehors du plan de C-H aromatique dépend principalement de la position des divers substituants fixés sur le noyau benzéniques et non pas de leur nature[37]. Nous notons l'existence des bandes vers $1150\text{-}1200\text{cm}^{-1}$ dans tous les produits séparés, ce qui confirme la présence d'un alcool aromatique correspond au vibration (C-O arom), et aussi les bandes vers 1033 à 1170cm^{-1} indiquent la présence d'un alcool primaire, secondaire ou même tertiaire [37,45].

Théoriquement les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques, les esters présentent une forte absorption pour l'élongation du groupe C=O entre 1800 et 1650cm^{-1} .

La conjugaison de la liaison (C=O) d'une cétone aliphatique avec un groupe (C=C) ou un groupe phényle donne une absorption avec une fréquence entre $1683\text{-}1661\text{cm}^{-1}$ [6, 37].

Des pics intenses vers 1591cm^{-1} et 1602cm^{-1} caractérisent une liaison éthylénique (C=C) qui peut être conjuguée avec un cycle aromatique.

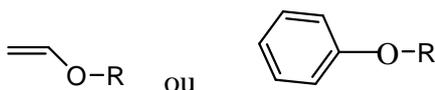
Une bande d'absorption en IR situé à $924, 984\text{cm}^{-1}$ caractérise une liaison éthylénique trans, tandis que la bande à 1601cm^{-1} peut être probablement, attribuée à la vibration de valence du groupe (C=C) conjugué.

Tab.4.49: Données spectrales IR des composés isolés (pastilles de KBr, fréquence en cm^{-1})

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	δ C-O	δ =C-H
Z m₁C₁	3459.18	2967.53 2918.39 2852.81	1629.14		1416.08		1022.76	623.98
Z m₁C₂	3355.39	2962.06 2923.82	1634.60	1514.42	1416.08	1284.98	1071.93	935.36 864.34 662.22
Z m₁Ac₁	3410.02	2967.53 2934.75 2858.27	1629.14	1508.95	1416.08 1459.79	1257.66	1104.70 1055.54 1028.22	995.45 924.43 864.34 667.68
Z m₁Ac₂	3610.24	2920.24 2850.25	1699.55 1640.99	1541.92 1523.59	1457		1098.65	800.32
Z m₁Ac₃	3432	3055 2956	1733	1596	1492	1257	1066	749
Z m₁B₁	3502.71	2963.41	1641.33	1542		1261.37	1096.11	802.09
Z m₂Ac₁	3443	2929	1684	1591	1421	1230	1033	973
Z m₂Ac₂	3367.36	2934.14	1654.33 1607.91	1508.24		1384.52	1070.56	809.65 632.13
Z m₂Ac₃	3460	2962 2874	1727	1602	1460	1285	1121	700
Z m₂Ac₄	3426	2956	1727	1662	1465	1274	1072	706
Ma₁C₂	3364,37	2924,23 2853,24	1732,96 1633,12		1411,81	1279,65	1133,88	703,78
Ma₁C₃	3448.24	2962.08 2874.66	1732.93 1601.82	1574.51	1465.25	1383.31 1279.51	1121.09 1039.15	968.13 793.32
Ma₁Ac₁	3480,3	2962.06 2852.81	1732.93	1541.73	1465.25	1383.31 1252.2	1164.8 1099.24	
Ma₁Ac₂	3502,21	2951.14 2923.82 2858.27	1738.39	1541.73	1459.79	1377.85 1268.59	1093.78 1022.76	
Ma₂Ac₁		2951.14 2912.9 2847.34	1727.47		1470.71	1377.85 1252.2		
Ma₂Ac₂	3410.02	2918.36	1732.93	1508.95	1465.25	1383.31	1071.93	837.03
Ma₂Ac₃	3442.79	2951.14	1727.47		1459.79	1388.77	1055.54	
Ma₂B₁		2925.37 2854.48	1735.27		1463.70	1377.59	1185.63	970.80
Ma₂B₂	3470	2951 2847	1733 1613	1536		1378	1170 1104	620,32
Ma₂E₁	3437.33	2956.6 2847.34	1732.93		1465.25	1383.31 1366.92		
Ma₂E₂	3371.78	2940.21 2874.65	1667.37 1601.82	1503.49	1459.79	1377.85 1268.59	1071.93	

La bande qu'apparaît à 1284.98-1257.66 cm^{-1} indique la présence d'un éther conjugué. La bande d'absorption vers 1250 cm^{-1} caractérise un éther -oxyde aryle-aliphatique.

Les bandes vers $1170,26\text{ cm}^{-1}$ et $1284,98\text{ cm}^{-1}$ attribuées aux éthers oxydes conjugués.



Nous remarquons aussi des pics intenses entre 1600 cm^{-1} et 1465 cm^{-1} et quelques pics assez importants dans la région des basses fréquences (grandes longueurs d'ondes) qui caractérisent les cycles aromatiques.

A partir de ces interprétations, on conclut que les structures les plus probables de ces composés sont des structures flavonoïdes qui peuvent être substitués par $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCOCH}_3$.

3.4.3. Spectres RMN:

Les résultats d'analyses spectroscopiques de différentes classes flavonoïdiques permettent de tirer des points essentiels pour l'interprétation des spectres RMN des flavonoïdes.

En **RMN- ^1H** , le proton en position 2 des isoflavones apparaît sous forme d'un singulet intégrant pour 1H avec un déplacement caractéristique vers 8 ppm, dû à sa proximité de l'oxygène en position 1.

Nous remarquons que les protons du cycle B ($\text{H}-2'$, $\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$, et $\text{H}-6'$) apparaissent généralement dans les zones comprises entre 6,5 et 8 ppm. Le cas où la position 4' est oxygénée nous remarquons quatre pics qui correspondent à deux doublets de doublets ($\text{H}-5'$ et $\text{H}-3'$) avec une constante de couplage d'environ 8,4 Hz. Tandis que les deux protons $\text{H}-2'$ et $\text{H}-6'$ prennent des valeurs comprises entre 6,60 et 7 ppm.

Les isoflavones isolées sont toujours oxygénées en 5, 7 et 4' [42].

- en position 5 : un proton phénolique chélaté avec un H spécifique aux alentours de 12 ppm ;
- en position 7 : un hydroxyle ou un oxygène engagé dans un cycle de type furane ;
- en position 4' : un hydroxyle ou un groupement méthoxyle.

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en C2-C3. Les protons en positions 2 et 3 apparaissent en RMN du proton sous la forme d'un système ABX avec un doublet de doublets autour de 5 ppm intégrant pour 1H pour le proton en position 2, et sous forme de deux doublets de doublets intégrant chacun pour 1H avec des déplacements chimiques autour de 3 ppm pour les deux protons en position 3.

En **RMN- ^{13}C** , on a remarqué que, pour toutes les molécules étudiées, le carbone C4 a la plus grande valeur du déplacement chimique. Ce carbone est déblindé par l'effet anisotrope de la double liaison $\text{C}=\text{O}$ et par l'électronégativité de l'atome d'oxygène (Effet électro-attracteur), qui lui rendent très faible en électrons, comme le montre la charge positive, donc un fort déblindage [42].

On a examiné les effets des substituants selon les spectres RMN ^{13}C de certaines flavones différentes qui possèdent comme cycle A, un 5,7 dihydroxyphenyl. On a constaté que les structures des polyhydroxyflavones peuvent être correctement proposées en estimant l'effet des substituants.

Les signaux des carbones en positions 2, 3 et 4 du cycle C sont peu affectés par les substituants du cycle B. Mais les signaux des carbones du cycle B, sont déplacés régulièrement par l'introduction d'un groupement hydroxy en position 3. Les résultats confirment que la substitution en position 3 affecte grandement le déplacement chimique. Les signaux des carbones dans le cycle A ne sont pas affectés par les substituants sur le cycle B et l'introduction du groupement hydroxy en position 3 n'affecte pas les signaux du cycle A. Les carbones correspondant sont situés à environ 78 ppm (C2) et 43 ppm (C3).

4. Elucidation structurale des produits isolés:

La détermination structurale a été effectuée sur la base des données spectrales (UV, IR, RMN) et par comparaison à la base des données de la littérature. L'attribution des numérotations des atomes, sur les composés flavonoïdiques, suit la règle de l'IUPAC [46].

Nous signalons, que dans le texte, les composés isolés sont indiqués par des codes.

Exemples: Ma_1C_1 et Zm_2Ac_2

Ma: *Moricandia arvensis* (espèce source), 1: 1^{er} protocole, C: extrait chloroformique, 1: 1^{er} composé

Zm: *Zilla macroptera* (espèce source), 2: deuxième protocole, Ac: extrait d'acétate d'éthyle, 2: 2^{ème} composé.

4.1. Le composé Ma_1C_2

$-\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$

$-302\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Tab. 4.50: Comportement chromatographique du composé Ma_1C_2

Système	BAW (4/1/5)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1/0.5)	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1)
R _f (fluorescence)	0.65 (bleu blanc)	0.14 (bleu)	0.38 (pourpre sombre)

Le comportement chromatographique (R_f et fluorescence sous UV (365 nm)) suggère une structure de type flavonoïde (une flavanone: sans double liaison entre C2 et C3) [47, 48].

Le spectre méthanolique nous donne deux maximums d'absorption, l'un correspond à la bande I (331 nm) et l'autre est celui de la bande II (255 nm), ces caractéristiques sont en faveur de la présence d'une flavanone au noyau A polysubstitué [49].

L'addition de NaOH provoque l'apparition d'une nouvelle bande (300 nm) indique la présence d'un OH libre en C7.

Le déplacement bathochromique (+35nm) de la bande I, suite à l'addition d'AlCl₃, indique la présence d'un groupement (-OH) en position 5 [50]. Les déplacements bathochromes (34 nm et 10 nm) des bandes I et II respectivement, enregistrés après addition de AlCl₃+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5.

Par comparaison des deux spectres AlCl₃/(AlCl₃+HCl), on remarque l'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I, ce qui indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di-OH sur le cycle B. Le déplacement bathochrome (9 nm) de la bande II après addition de NaOAc confirme la présence d'un OH libre en position 7.

L'ajout de H₃BO₃ ne provoque qu'un très faible déplacement bathochromique (1) de la bande I, ce qui confirme l'absence du groupe di-OH en C3' C4'[40].

Tab. 4.51: Données de la série spectrale UV du composé Ma₁C₂

réactifs	Bande I λ _{max} (nm)	Bande II λ _{max} (nm)	Autres bandes λ _{max} (nm)	commentaires
MeOH	331	255		Flavanone
NaOH+ MeOH	330	255	300	OH libre en C7
MeOH +AlCl ₃	366	254	300	OH libre en 5
AlCl ₃ +HCl +MeOH	365	265		Pas de di- OH Sur le cycle B
MeOH +AcONa	331	264		OH libre en 7
MeOH +AcONa/H ₃ BO ₃	332	265	/	Pas de di- OH sur le cycle B

Tab.4.52: Données du spectre IR(cm⁻¹) du composé Ma₁C₂

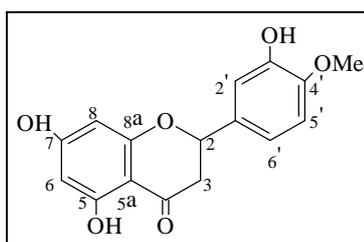
	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Ma₁C₂	3364,37	2924,23 2853,24	1732,96	1411,81	1279,65	1133,88	703,78

-L'examen du spectre RMN ¹H montre: Un signal qui apparaît à 6,82 ppm (*J* = 2, 1 Hz) sous forme d'un doublet d'intégration 2H attribué aux protons H-2' et H-6', un doublet qui apparaît à 6,76 ppm (*J* = 8,2 Hz), permet l'attribution de ce signal d'intégration 1H à H-5'. Deux signaux à 5.96 ppm sous forme de deux singulets d'intégration 1H chacun, attribuables à H-8 et H-6. Un doublet à 3,19 ppm d'intégration 2H attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavanone.

Tab.4.53: Données de la série spectrale RMN ¹H et RMN ¹³C du composé Ma₁C₂

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C		
	δ (ppm)	m		δ (ppm) DMSO-d6	δ (ppm) DMSO [51]	δ (ppm) (CD ₃) ₂ CO [52]
2	5.60	dd		77.1	78.6	79.79
3	3.19	dd		42.5	42.8	43.52
4				197	195.5	197.1
5	12.4 (5-OH)			164.6	164	165.3
5a				102.2	102.2	103.3
6	5.96	s		96.2	96.4	96.87
7				166.5	166.9	167.4
8	5.96	s		95.2	95.4	95.91
8a				164.1	162.9	164.3
1'				129.3	131.3	132.8
2'	6.82	d	2,1	117.2	113.6	114.4
3'				143.2	146.6	147.6
4'				140.1	147.9	148.7
5'	6.76	d	8,2	119.3	111.5	112.4
6'	6.82	d	2,1	115.3	117.7	118.8
4'-OCH ₃	3.85	s		56.1		

Les résultats précédents nous suggèrent la structure suivante:

**Fig. 4.10:** Structure de 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone (*Hesperitine*)

4. 2. Le composé Ma₁C₃

-C₁₈H₁₆O₆

-328g.mol⁻¹

-poudre jaune

Le produit Ma₁C₃ a été isolé à partir de l'extrait chloroformique.

Tab.4.54: Comportement chromatographique du composé Ma₁C₃

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH / H ₂ O (9/1 /0.5)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.62 (violet)	0.13 (jaune pale)	0.53 (violet)

Le comportement chromatographique (R_f et fluorescence sous UV (365 nm)) suggère une structure de type flavonoïde. Le spectre UV dans le méthanol donne une bande à 329 nm relatif d'une flavone. Les résultats UV (Tableau 4.55) enregistrés confirment cette suggestion.

Tab.4.55: Données spectrales UV du composé Ma_1C_3

réactifs	Bande I λ max (nm)	Bande II λ max (nm)	Commentaires
MeOH	329	276	Flavone
MeOH +NaOH	374	296	OH non libre en 4' OH non libre en 7
MeOH +AlCl ₃	349	299	OH libre en 5
MeOH +AlCl ₃ +HCl	348	299	Pas d'ortho di- OH Sur le cycle B
MeOH +AcONa	330	279	OH non libre en 7
MeOH +AcONa+H ₃ BO ₃	330	269	Pas d'ortho di- OH Sur le cycle B

L'absence d'une nouvelle bande dans le spectre du méthanol additionné de NaOH, qui montre un déplacement bathochrome de la bande I de 45 nm, indique des hydroxyles non libres en C4' et C7. Le méthanol additionné d'AlCl₃ provoque un dédoublement de la bande II et un déplacement bathochrome de 20 nm de la bande I, l'ajout de HCl n'a eu aucun effet; ce ci indique l'absence d'un système ortho-di-OH sur le noyau B [40,53].

La comparaison du spectre UV dans le (MeOH+AcONa) avec celui de (MeOH + AcONa +H₃BO₃) montre une stabilité du spectre confirmant l'absence d'un OH libre en C7 et l'absence d'un système ortho- di-OH sur le noyau B.

Tab.4.56: Données du spectre IR (cm^{-1}) du composé Ma_1C_3

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	δ =C-H arom.
Ma₁C₃	3448.24	2962.08 2874.66	1732.93	1601.82 1574.51	1465.25	1383.31 1279.51	1121.09 1039.15	968.13 793.32

-L'examen du spectre RMN ¹H montre : Deux singulets à 6, 57 ppm et à 6.52 d'intégration 1H chacun attribuables à deux protons (probablement de H3 et H8) [54].

Tab.4.57: Données spectrales RMN¹H et RMN¹³C du composé Ma_1C_3

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C
	δ (ppm) CDCl ₃	m		δ (ppm) DMSO-d ₆
2				164
3	6,57	s		103
4				182
5	12.8 (OH-5)	s		152
5a				105
6	3.89 (OCH3)	s		132
7	3.90(OCH3)	s		159
8	6.52	s		91.5
8a				153
1'				123
2'	6,99	d	8.4	128
3'	7,82	d	8.4	115
4'	3.95 (OCH3)	s		162
5'	7,82	d	8.4	114
6'	6,99	d	8.4	127.8

Le signal à 6,99 ppm, d'intégration 2H est attribuable à H-2' et H-6'. Le signal à 7,82 ppm ($J = 8,4\text{Hz}$) qui apparaît sous forme de doublet, d'intégration 2H est attribuable à H-5' et H-3'. Les trois méthoxyles sont caractérisés par trois signaux à 3.89, 3.90 et 3.95 ppm.

L'ensemble de données spectrales (UV, IR, RMN) nous mènent à identifier Ma_1C_3 au (5-hydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone) [55].

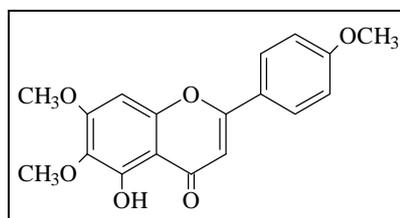


Fig.4.11: Structure de 5-hydroxy 6, 7, 4'-triméthoxyflavone.

4.3. Le composé Ma_1Ac_1

- $C_{16}H_{12}O_6$

- $300\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

La pulvérisation du chromatogramme de gel de silice par une solution éthanolique d' $AlCl_3$ (1%), révèle l'apparition des taches jaunes, cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes.

Tab.4.58: Comportement chromatographique du composé Ma_1Ac_1

système	BAW (4/1/5)	$CHCl_3/MeOH/H_2O$ (9/1/0.5)	Toluène / $(CH_3)_2CO/ MeOH$ (4/3/3)
R _f (fluorescence)	0.88 (violet)	0.39(violet)	0.51 (violet)

Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f montre qu'il s'agit d'un aglycone. La fluorescence violette sous UV à 365nm nous laissent opter pour un flavone ou pour un flavonol substitué en 3[47].

Les données numériques du spectre UV (tableau 4.59) montrent: En présence du méthanol, une valeur de 333 nm de la bande I et 265nm de la bande II, ce qui nous oriente vers la structure d'un flavone. Le spectre (MeOH+ NaOH) montre un déplacement bathochrome (54 nm) de la bande I et une nouvelle bande à 324nm, ce qui témoigne l'existence du groupement hydroxyle en position 4' et en position 7 respectivement. Le déplacement bathochromique (10 nm) de la bande II, après l'ajout du AcONa, confirme la substitution en position 7.

Le spectre (MeOH + $AlCl_3$) montre un déplacement bathochrome de (21 nm) de la bande I, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en position C-6. L'ajout de HCl ne déplace pas la bande I, en comparant les deux spectres $AlCl_3 / (AlCl_3+HCl)$. Ce ci indique l'absence du groupement ortho di-OH sur le cycle B.

Tab.4.59: Données spectrales UV du composé Ma_1Ac_1

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	commentaire
MeOH	333	265	/	Flavone
MeOH +NaOH	387	270	324	OH libre en 4' OH libre en 7
MeOH +AlCl ₃	354	268		OH libre en 5
MeOH+AlCl ₃ +HCl	354	270		Oxygénation en position C-6 Pas de di- OH en C3'C4'
MeOH +AcONa	336	275	324	OH libre en 7
MeOH+AcONa/H ₃ BO ₃	337	269	/	Pas de di- OH en C3'C4'

Tab.4.60: Données du spectre IR (cm^{-1}) du composé Ma_1Ac_1

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O
Ma_1Ac_1	3480,3	2962.06 2852.81	1732.93	1541.73	1465.25	1383.3 1252.2	1164.8 1099.24

-L'examen du spectre RMN ¹H, enregistré dans DMSO, montre quatre signaux, chacun sous forme d'un singulet. Le premier à 6, 65 ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 ou H-3, le deuxième à 13, 01 ppm d'intégration 1H attribuable au groupe (-OH) en position C-5, le troisième à 3, 98 ppm d'intégration 3H attribuable au groupe méthoxyle (-OCH₃) en position C-6, le quatrième à 6, 70 ppm d'intégration 1H attribuable à H-3 ou H-8. Deux doublets d'intégration 2H chacun, le premier à 7, 88 ppm, le second à 6, 90 ppm ($J = 8, 2$ Hz) attribuables à (H-2', H-6') et (H-3', H-5') respectivement (Tab.4.61).

Tab.4.61: Données spectrales RMN¹H et RMN¹³C du composé Ma_1Ac_1

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C	
	δ (ppm)	<i>m</i>		δ (ppm)	DMSO-d ₆
2					163
3	6,70 ou 6,65	s			103
4					182
5	13,01 (C ₅ -OH)	s			148
5a					103
6	3,98(C ₆ -OCH ₃)				132
7					151
8	6,70 ou 6,65	s			94
8a					152
1'					123
2'	7,88	d	8,2		127,6
3'	6,90	d	8,2		115
4'					162
5'	6,90	d	8,2		115
6'	7,88	d	8,2		128

Le spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (annexe A) [102] montre un pic moléculaire à $m/z = 300$ $[M]^+$, confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de

formule brute $C_{16}H_{12}O_6$. Ce spectre montre également un signal à $m/z = 272$ correspondant au réarrangement caractéristique des flavonoïdes, soit la perte d'un CO $[M-28]^+$, un signal à $m/z = 257$ correspondant à $[M-28-15]^+$ connu pour ce type de composé et un signal à $m/z = 167$ confirmant bien un cycle A comportant deux hydroxyles et un méthoxyle[102].

Toutes ces données sont en accord avec celles de la littérature [56-58].

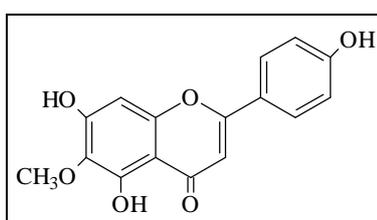


Fig.4.12: Structure de (4', 5,7-trihydroxy 6-methoxyflavone (ou Hispiduline)).

4. 4. Le composé Ma_1Ac_2

- $C_{17}H_{14}O_6$

-314g.mol⁻¹

Le composé Ma_1Ac_2 se présente sous forme d'une poudre jaune, il a été isolé de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Tab.4.62: Comportement chromatographique du composé Ma_1Ac_2

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH (9/1)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.68 (pourpre sombre)	0.43(pourpre sombre)	0.52 (pourpre sombre)

Le comportement chromatographique (le R_f et la couleur pourpre sombre sous 365) et le spectre UV présentant un maximum à 262 nm (bande II) et un épaulement à environ 320 nm (bande I) orientent vers une structure d'isoflavone[35,47].

Les données de la série spectrale UV (tableau 4.63) donnent les indications suivantes: La stabilité du spectre enregistré après addition de NaOH avec le temps (5mn) comparativement à celui enregistré dans le MeOH laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Le spectre méthanol en présence de AlCl₃ présente un déplacement bathochrome (40 nm) de la bande I ce qui montre la présence d'un groupement (-OH) en position 5[50]. Les déplacements bathochromes (40 nm et 11nm) des bandes I et II respectivement, enregistrés après addition de AlCl₃+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5. L'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I après comparaison des deux spectres AlCl₃/(AlCl₃+HCl) indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di-OH sur le cycle B.

Le déplacement bathochrome (7nm) de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7. Cet argument est confirmé par l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm. L'ajout de H₃BO₃ ne provoque qu'un très faible déplacement bathochromique (+1) de la bande I, ce qui témoigne l'absence du groupe OH en C3' C4'.

Tab.4.63: Données de la série spectrale UV du composé Ma₁Ac₂

réactifs	Bande I λ _{max} (nm)	BandeII λ _{max} (nm)	Autres bandes	Commentaire
MeOH	320	262		isoflavone
MeOH +NaOH	320	262		Pas de di-OH sur le cycle B
MeOH +NaOH après 5mn	320	262		
MeOH +AlCl ₃	360	265		OH libre en 5 pas de di- OH sur le cycle B
MeOH+AlCl ₃ +HCl	360	273		
MeOH +AcONa	320	269	325	OH libre en 7
MeOH+AcONa/H ₃ BO ₃	321	269	325	Pas de di- OH sur le cycle B

Tab.4.64: Données du spectre IR(cm⁻¹) du composé Ma₁Ac₂

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O saturé	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	δ =C-H arom.
Ma₁Ac₂	3502,21	2951.14 2923.82 2858.27	1738.39	1541.73	1459.79	1377.85	1093.78 1022.76	

-Le spectre de RMN ¹H (annexe A) montre: Un signal à 8,17 ppm caractéristique du proton en position 2 des isoflavonoïdes; Un signal à 12,96 ppm correspond à un OH en position 5.

Tab.4.65: Données spectrales RMN ¹H et RMN ¹³C du composé Ma₁Ac₂

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C
	δ (ppm)	m		δ (ppm)
2	8,17	s		163
3				103
4				182
5	12,96(OH-C5)	s		148
5a				103
6	6,21	s		98.9
7				157
8	6,39	s		94
8a				151
1'				122
2'	7,47	d	1,9	130
3'	3,88(3'- OCH ₃)	s		162.1
4'	3,96(4'- OCH ₃)	s		162
5'	6,88	d	8,2	114
6'	7,50	d	1,9	129

Le spectre montre aussi un doublet à 7,50 ppm ($J = 1,9$ Hz) d'intégration 1H partiellement recouvert par un doublet d'intégration 1H à 7,47 ppm ($J = 1,9$ Hz) attribuables à H-6' et H-2' respectivement. Un signal à 6,88 ppm ($J = 8,2$ Hz) sous forme d'un doublet d'intégration 1H attribuable à H-5'. Ces signaux indiquent une disubstitution du noyau B. Deux signaux à 6,39 et 6,21 ppm sous forme de singulets, correspondent aux protons H-8 et H-6 respectivement. Deux singulets à 3,96 ppm et à 3,88 ppm d'intégration 3H chacun, révélant la présence de deux groupements méthoxyles sur le cycle B.

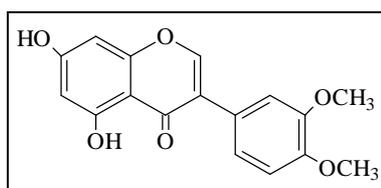


Fig.4.13. structure du composé Ma_1Ac_2
(5, 7-dihydroxy-3', 4'-diméthoxyisoflavone) [59-63].

4. 5. Le composé Ma_2Ac_2

- $C_{18}H_{16}O_7$

-344g.mol⁻¹

Tab.4.66: Comportement chromatographique du composé Ma_2Ac_2

Système	BAW (4 / 1 / 5)	H ₂ O / MeOH / CH ₃ Cl (0.5 / 1 / 9)	(CH ₃) ₂ CO / H ₂ O (1 / 1)
R _f (fluorescence)	0.32 (jaune)	0.93 (jaune)	0.86 (jaune)

Le produit Ma_2Ac_2 donne une tache de couleur jaune sous lumière UV (365 nm) suggérant une structure d'un flavonol.

Tab.4.67: Données spectrales UV du composé Ma_2Ac_2

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	commentaires
MeOH	356	270	Flavonol (3-OR)
MeOH + NaOH	357	271, 280	4' - OR et 7 - OH
MeOH + AlCl ₃	391	272	OH libre en 5 et 3-OMe
MeOH + AlCl ₃ +HCl	390	271	Pas de di- OH sur le cycle B
MeOH + AcONa	355	278	OH libre en 7
MeOH+AcONa +H ₃ BO ₃	356	276	Pas de di- OH sur le cycle B

Le spectre UV du composé Ma_2Ac_2 dans le méthanol donne une bande à 356 nm et une autre à 270 nm, suggérant un flavonol (3-OR). La comparaison du spectre NaOH par rapport au spectre MeOH montre un faible déplacement avec diminution d'intensité, confirmant l'existence d'un hydroxyle libre en C7 et une substitution en C4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 280 nm confirme un OH libre en C7. L'addition d'AlCl₃ donne un déplacement bathochrome (35 nm) de

la bande I, la persistance de cet effet après acidification par HCl indique un OH libre en C-5 et une substitution en C-3 (3-OMe). La comparaison des spectres $\text{AlCl}_3+\text{HCl} / \text{AlCl}_3$ résulte d'un faible déplacement hypsochromique (- 1nm), ce qui confirme l'absence du groupe ortho di-OH en C3' C4'[78].

La comparaison du spectre AcONa par rapport au spectre MeOH montre un déplacement bathochrome (8 nm) de la bande II confirmant la présence d'un OH libre en C7.

La comparaison du spectre AcONa + $\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{MeOH}$ ne donne aucun effet, cela peut être due à l'absence du groupe OH en C3' C4'.

Tab.4.68: Données spectrales IR (cm^{-1}) du composé Ma_2Ac_2

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O saturé	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O
Ma₂Ac₂	3410.02	2918.36	1732.93	1508.95	1465.25	1383.31	1071.93

-L'analyse du spectre RMN^1H , indique la présence de trois méthoxyles à 3.96, 3.97 et 3,99 ppm, quatre protons aromatiques : deux à 7.51 (H-2', H-6') et deux autres à 6.91 ppm (H-3', H-5'), un éthylénique à 6.53 ppm (H-8). On a un signal à 12.8 ppm relatif à un hydroxyle (5-OH).

-Le spectre RMN^{-13}C montre trois signaux à 56.10, 56.40 et 59.01 ppm, relatifs à des carbones primaires attachés d'un oxygène (méthoxyles), trois signaux à 94, 114 et 130 ppm correspondant à des carbones tertiaires (sp²) et dix carbones quaternaire dont un de type carbonyle à 178 ppm caractéristique d'un flavonoïde. Donc, on a dix-huit carbones[54].

Tab.4.69: Données spectrales RMN^1H et RMN^{13}C du composé Ma_2Ac_2

Position	^1H		J (Hz)	^{13}C
	δ (ppm)	m		δ (ppm) DMSO
2				155
3				138
4				178
5	12.8(5-OH)			152
5a				105
6				131
7				157
8	6.53	s		94 (C-H)
8a				152
1'				122
2'	7.51	d	8.4	130 (C-H)
3'	6.91	d	8.4	114 (C-H)
4'				161
5'	6.91	d	8.4	114 (C-H)
6'	7.51	d	8.4	130 (C-H)
OCH ₃ (C-3)	3.96	s		56.10 CH ₃
OCH ₃ (C-6)	3.97	s		56.40 CH ₃
OCH ₃ (C-4')	3,99	s		59.01 CH ₃

D'après les données spectrales précédentes, la structure la plus probable est le 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone.

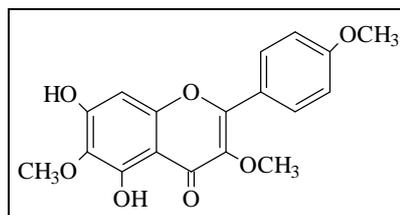


Fig. 4.14: Structure du composé 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone

4. 6. Le composé Ma_2Ac_3

- $C_{19}H_{18}O_9$

-390 g.mol⁻¹

Tab.4.70: Comportement chromatographique du composé Ma_2Ac_3

Système	BAW (4/1/5)	H ₂ O / MeOH / CH ₃ Cl (0.5/1/9)	(CH ₃) ₂ CO / H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.43 (jaune)	0.09 (jaune)	0.84 (jaune)

Le rapport frontal et la fluorescence jaune sous lumière de Wood laissent envisager la structure d'une flavone ou un flavonol substitué 3-OR.

-L'examen de la série spectrale UV (Tableau 4.71) montre : La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 352 nm et de la bande II à 272 nm, est en faveur d'une structure de type flavonol substitué en C-3 (flavonol 3-OR).

La présence d'un OH libre sur C-4' est révélé par un déplacement bathochrome (40 nm) de la bande I avec une augmentation de l'intensité après l'ajout de NaOH. L'apparition d'une nouvelle bande à 283 nm confirme un OH libre en C7. La comparaison du spectre (MeOH + NaOAc) par rapport au spectre MeOH montre un déplacement bathochrome (6 nm) de la bande II, confirmant la présence d'un OH en C-7.

Le spectre (MeOH + AlCl₃) montre un déplacement bathochrome (32 nm) de la bande I, la persistance de cet effet après acidification par HCl indique un OH libre en C5, une substitution en C3 (3-OMe) et une oxygénation en C-6.

Par comparaison du spectre (AlCl₃+HCl) avec celui d'AlCl₃, on remarque un faible déplacement hypsochromique (- 2nm), ce qui confirme l'absence du groupe ortho di OH en C3' C4'[40]. La comparaison du spectre (MeOH + AcONa + H₃BO₃) / MeOH ne montre aucune différence, cela confirme l'absence du groupe ortho di-OH sur le cycle B [40].

Tab.4.71: Données de la série spectrale UV du composé Ma_2Ac_3

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	commentaires
MeOH	352	272	Flavonol (3-OR)
MeOH +NaOH	392	271, 283	4' – OR et 7 - OH
MeOH +AlCl ₃	384	272	OH libre en 5 et 3-OMe une oxygénation en C-6 Pas de di- OH sur le cycle B
MeOH + AlCl ₃ +HCl	382	271	
MeOH +AcONa	352	278	OH libre en 7
MeOH+AcONa +H ₃ BO ₃	352	276	Pas de di- OH sur le cycle B

Tab.4.72 : Données spectrales IR(cm^{-1}) du composé Ma_2Ac_3

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O saturé	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ OH	ν C-O
Ma₂Ac₃	3442.79	2951.14	1727.47		1459.79	1388.77	1055.54

-L'étude du spectre RMN ¹H (annexe A) donne les indications suivantes: Un signal à 12,45 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 1H confirme la présence d'un OH libre en position 5 . Un singulet à 7.80 ppm d'intégration 1H attribuable à H-2'. Deux doublets à 7.68 ppm et à 6.98 ppm (J = 8,2 Hz) d'intégration 1H chacun, attribuables à H-6' et à H-5' respectivement. Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une disubstitution du noyau B. Quatre signaux à 4.01, 3.96, 3.84 et 3.83 ppm sous forme de singulets d'intégration 3H chacun, attribuables aux groupements méthoxyles.

Tab.4.73: Données spectrales RMN¹H et RMN¹³C du composé Ma_2Ac_3

Position	¹ H			¹³ C
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) DMSO
2				150,9
3				135,2
4				176
5	12,45			152,2
5a				102,9
6				93,6
7				157,0
8				131,0
8a				144,9
1'				123,1
2'	7.80	s		114,8
3'				146,2
4'				147,2
5'	6,98	d	8,2	115,3
6'	7,68	d	8,2	121,2
C3'-O CH ₃	4,01	s		60,4
C6-OCH ₃	3,96	s		60,2
C8-OCH ₃	3,84	s		59,8
C3-COCH ₃	3,83	s		56,41

Les données (UV, IR, RMN¹H et RMN¹³C) reportées précédemment, sont en accord avec celles de la littérature [56,57,64] et mènent à la structure: 5,7,4'-trihydroxy-3,6,8,3'-tetraméthoxyflavone.

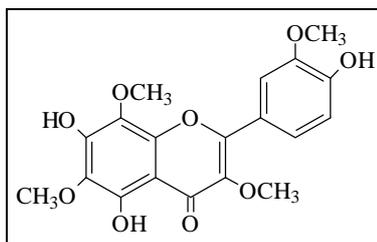


Fig.4.15. Structure de 5,7,4'-trihydroxy-3,6,8,3'-tetraméthoxyflavone.

4.7. Le composé Ma₂B₂

-C₁₅H₁₂O₇

-304 g.mol⁻¹

-Poudre jaune

Tab.4.74: Comportement chromatographique du composé Ma₂B₂

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (9/1/0.5)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
Rf (fluorescence)	0.80 (bleue)	0.04 (bleue)	0.32 (bleue)

Le comportement chromatographique nous suggère une structure d'un flavanone avec OH en C3 [47, 48].

Tab.4.75: Données spectrales UV du composé Ma₂B₂

Réactif	Bande I λ _{max} (nm)	Bande II λ _{max} (nm)	Autres bandes	commentaire
MeOH	351	249		Flavane ou flavanol
MeOH + NaOH	391	250	325	OH libre en C4' OH libre en C7
MeOH + AlCl ₃	381	249		OH libre en C5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	361	251		Présence de di OH en C3' C4'
MeOH + NaOAc		265	-	OH libre en C7
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	361	264	-	Présence de di-OH en C3' C4'

Le spectre méthanolique nous donne deux maximums d'absorption l'un correspond à la bande I (351 nm) et l'autre est celui de la bande II (249 nm), ces caractéristiques sont en faveur de la présence d'un flavanol (3-OH) au noyau A polysubstitué. L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique (40 nm) de la bande I, traduisant la présence d'un OH libre en C4'. L'apparition d'une nouvelle bande (325 nm) indique la présence d'un OH libre en C7. Le déplacement bathochromique (30nm) de la bande I, suite à l'addition d'AlCl₃, indique que la molécule a un OH libre en C5. L'effet hypsochrome (-20nm) en comparant le spectre en présence d'HCl (AlCl₃+ HCl par rapport à AlCl₃) nous confirme la présence du groupement ortho di OH sur le cycle B. Le AcONa ajouté, provoque un déplacement bathochromique (16 nm) de la bande

Il cela confirme la disposition d'un OH libre en C7. L'ajout de H_3BO_3 conduit à un déplacement bathochromique (10nm) de la bande I indiquant la présence d'un groupe ortho di OH en C3'C4'.

-Le spectre IR montre une bande O-H au voisinage de 3470 cm^{-1} . Une bande d'absorption à 1104 cm^{-1} qui est caractéristique du groupement C-O d'un éther aliphatique. La vibration à 620 cm^{-1} note la présence d'un cycle benzénique, une confirmation supplémentaire vient des bandes d'élongation des C-H aromatiques se situent à la limite des hautes fréquences des élongations des C-H aliphatiques.

Tab.4.76 : Données spectrales IR(cm^{-1}) du composé Ma_2B_2

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Ma₂B₂	3470	2951 2847	1733	1536	1455.2	1378	1170 1104	620,32

L'examen du spectre de RMN 1H (tableau4.77) montre: Deux signaux à 6,17 et à 6,37 ppm sous forme de singulets d'intégration 1H chacun, caractéristiques des protons H-6 et H-8 respectivement; Un singulet à 12.8 ppm, attribuable à un OH en C-5; Deux autres signaux (singulet et doublet) à 7,55 ppm et 6,98 ($J = 2,2\text{ Hz}$) attribuables H-2', H-6'[65]. Le doublet à 6.83 ppm ($J = 7.1\text{Hz}$) d'intégration 1H, est attribuable à H-5'.

Tab.4.77: Données spectrales RMN 1H et RMN ^{13}C du composé Ma_2B_2

Position	1H			^{13}C		
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) DMSO-d ₆	δ (ppm) DMSO [66]	δ (ppm) MeOH-d ₄ [67]
2				79.8	81	83
3				27.54	27.8	28.6
4				160.10	156.2	157.7
5	12.8 (OH-C5)	s		67.34	66.3	68.9
5a				99.8	99	100.9
6	6,17	s		96.30	95.1	96.4
7				156.88	156.4	157.9
8	6,37	s		93.01	93.8	95.6
8a				156.80	155.3	157
1'				130.85	130.6	132.3
2'	7,55	s		116.10	114.5	115.4
3'				145.78	144.8	146.4
4'				145.81	144.8	146.3
5'	6.83	d		115.01	115	116.2
6'	6,98	d	2,2	118.60	118.4	120.2

Donc la structure la plus probable, d'après les données spectrales si dessus, est le 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxy flavanone.

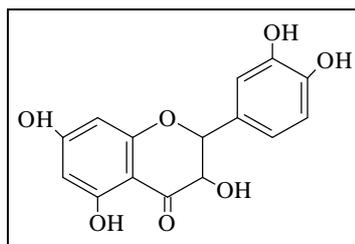


Fig. 4.16: Structure de 3,3',4', 5,7- pentahydroxy flavanone (taxifoline)

4. 8. Le composé Ma_2E_1

- $C_{20}H_{18}O_{11}$

-434 $g \cdot mol^{-1}$

-Poudre jaune

Tab.4.78: Comportement chromatographique du composé Ma_2E_1

système	BAW (4/1/5)	$CHCl_3/MeOH/H_2O$ (9/1/0.5)	Toluène/ MeOH / EtOH / éther de pétrole (2/1.5/1/0.5)
R _f (fluorescence)	0.90 (jaune)	0.43 (jaune pâle)	0.32 (mauve)

Le comportement chromatographique nous suggère qu'il est fort possible qu'on a un sucre en C-3 ou en C-7 sinon les deux, car la glycosylation fait diminuer les valeurs des R_f (0.32).

Tab.4.79: Données spectrales UV du composé Ma_2E_1

Réactif	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	commentaire
MeOH	340	281		Flavone ou flavonol
MeOH + NaOH	382	283	328	OH libre en 4' OH libre en C7
MeOH + $AlCl_3$	370	281		OH libre en C5
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	345	282		di-OH en C3' C4'
MeOH + AcONa		297	-	OH libre en C7
MeOH + AcONa + H_3BO_3	358	296	-	di-OH en C3' C4''

Le spectre méthanolique nous donne deux maximums d'absorption l'un correspond à la bande I (340 nm) et l'autre est celui de la bande II (281 nm), ces caractéristiques sont en faveur de la présence d'un flavonol (3-OR) au noyau A polysubstitué.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de (42 nm) traduisant la présence d'un OH libre en C4', l'apparition d'une nouvelle bande (328 nm) indique la présence d'un OH libre en C-7.

Le déplacement bathochromique (30nm) suite à l'addition d' $AlCl_3$ indique que la molécule a un OH libre en C5. L'effet hypsochrome (-25nm) en comparant le spectre (MeOH + $AlCl_3$ + HCl) / (MeOH + $AlCl_3$) nous confirme la présence du groupement ortho di OH en cycle B.

L'acétate de sodium (AcONa) ajouté, provoque un déplacement bathochromique 16 nm) de la bande II cela confirme la disposition d'un OH libre en C-7.

L'ajout de H₃BO₃ conduit à un déplacement bathochromique de (18nm) indiquant la présence d'un groupe ortho di-OH en C3'C4'.

Tab.4.80 : Données spectrales IR(cm⁻¹) du composé Ma₂E₁

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	δ =C-H arom.
Ma₂E₁	3437.33	2956.6 2847.34	1732.93	1486	1465.25	1383.31 1366.92	1168 1104	625,3

-L'examen du spectre de RMN ¹H (tableau 4.81) montre la présence de: Deux singulets à 6,15 et à 6,33 ppm d'intégration 1H chacun, caractéristiques des protons H-6 et H-8 respectivement. Un singulet à 12.7 ppm, attribuable à un OH en C-5; Deux signaux à 7,10 ppm sous forme d'un singulet et doublet d'intégration 1H chacun, attribuable à H-2' et à H-6' [35]. Un doublet à 5,22 ppm ($J=5,1$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre lié à l'aglycone par une liaison C-O (en position 3), car toutes les autres positions sont occupées par des protons; Trois doublets d'intégration 1H chacun à 3.70 ppm ($J = 7.1$ Hz), 3.50ppm ($J = 5.1$ Hz) et 3.61ppm ($J = 5.1$ Hz).

Tab.4.81: Données spectrales RMN ¹H et RMN ¹³C du composé Ma₂E₁

Position	¹ H			¹³ C		
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) DMSO-d ₆	δ (ppm) [51]	δ (ppm) [68]
2				146.9	147.4	156.2
3				135.9	136.7	133.5
4				176	176.7	177.4
5	12.7 (5-OH)			160.9	161.9	161.1
5a				103.2	103.9	103.7
6	6.15	s		98.3	98.6	98.7
7				164	165	164.5
8	6.33	s		93.5	93.8	93.5
8a				156.3	157.6	156.1
1'				122.2	123.5	121
2'	7.1	s		115.3	115.4	115.6
3'				145.2	145.6	144.8
4'				147.8	148.2	148.5
5'	6.80	d	8.4	115.8	115.6	115.4
6'	7.10	d	2.1	120.1	121.1	121.8
1''	5.22	d	5.1	99.1		101.4
2''	3.70 (2''-OH)	d	5.1	65		70.6
	2,59		7.1			
3''	3.50(3''-OH)	d	5.1	72.1		71.5
	2,48	t	7.1			
4''	3.61(4''-OH)	d	5.1	56.2		59.9
	2,70	t	5.1			
5''	3.20	d	5.1	63		64.5

On remarque que les valeurs des constantes de couplage sont caractéristiques de couplages vicinaux de protons de groupements hydroxyles avec des groupements CH. Ces observations orientent vers la présence de trois groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

Cette hypothèse est appuyée par la présence d'un triplet de doublets d'intégration 1H à 2,59 ppm ($J = 7,1\text{Hz}$) et un multiplet à 2,48 ppm ($J = 7,1\text{ Hz}$) et à 2,70 ppm ($J = 3,2\text{ Hz}$). D'après les valeurs des constantes de couplage de ces noyaux, il apparait clairement que ces signaux sont attribuables aux trois protons des trois groupements CH porteurs des trois hydroxyles.

Un doublet à 3.20 ppm ($J = 2.0\text{ Hz}$), d'intégration 1H. D'après les résultats précédents, ce CH doit faire partie du cycle de l'entité sucre.

-L'examen du spectre RMN ^{13}C révèle la présence d'un groupement CH_2OH à 59,9 ppm, orientant ainsi vers un substituant de type glucosyle.

Donc la structure la plus probable, d'après les données spectrales ci dessus, est:

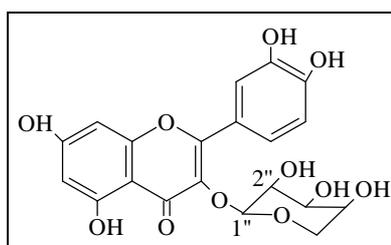


Fig.4.17: Structure de 3- glycosyl 3',4',5 ,7 tetrahydroxy flavonol
ou 3- glycosyl quercétine

4. 9. Le composé Ma_2E_2

- $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$

- 610 g.mol^{-1}

-solide amorphe jaune pale

Tab.4.82: Comportement chromatographique du composé Ma_2E_2

système	BAW (4/1/5)	MeOH/ H_2O / ACOH/ (20/1/1)	toluène/ MeOH / EtOH /éther de petrole (2/1.5/1/0.5)
R_f (fluorescence)	0.59 (jaune)	0.43 (jaune pale)	0.20 (jaune terne)

Le produit a été obtenu à l'état pur, sous forme d'un solide amorphe jaune pale, par chromatographie sur colonne après une ultime filtration.

La fluorescence sous lumière de Wood et le R_f indiquent qu'il s'agit d'un flavonol 3-OR hétérosidique avec 5-OH [39, 49].

Le spectre d'absorption UV enregistré dans le méthanol, montre des bandes d'absorption maximales à 355 nm de la bande I et 265 nm de la bande II caractéristiques d'une structure de type flavonol 3-OR [62].

L'addition de NaOH provoque le déplacement bathochrome (20 nm) de la bande I et l'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm, ce qui révèle la présence d'un OH libre en C4' et un OH libre en C-7, ceci est confirmé par le déplacement bathochrome (15nm) de la bande II après l'ajout de NaOAc.

Le spectre (MeOH+AlCl₃) montre un effet bathochrome (43nm) de la bande I comparativement à celui enregistré dans le MeOH, ce qui confirme le squelette d'un flavonol et indique la présence d'un OH libre en 5.

Tab.4.83: Données de la série spectrale UV du composé Ma_2E_2

Réactif	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	BandeII $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	Commentaire
MeOH	355	265		flavonol 3-OR
MeOH + NaOH	375	283	327	OH libre en 4' OH libre en C7
MeOH +AlCl ₃	398	281		OH libre en C5
MeOH +AlCl ₃ + HCl	398	282		pas de di- OH en cycle B
MeOH + AcONa	358	280	-	OH libre en C7
MeOH + AcONa +H ₃ BO ₃	358	296	-	Pas de di -OH en cycle B

En comparant les deux spectres (MeOH +AlCl₃ + HCl) et (MeOH+AlCl₃), on ne remarque pas de déplacement hypsochrome de la bande I, ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxylé sur le cycle B. Ce ci est confirmée par l'absence de déplacement bathochrome de la bande I en comparant le spectre (MeOH + AcONa + H₃BO₃) et le spectre (MeOH + AcONa).

-Le spectre IR du composé Ma_2E_2 montre des bandes d'absorption à 3371, 1667 et 1503 cm⁻¹ correspondant à la présence des groupements hydroxyle, carbonyle et une double liaison.

Tab.4.84: Données spectrales IR (cm⁻¹) du composé Ma_2E_2

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O
Ma_2E_2	3371.78	2940.21 2874.65	1667.37	1601.82 1503.49	1459.79	1377.85 1268.59	1071.93

-Le spectre RMN¹H du composé Ma_2E_2 montre la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonoïque de type flavonol. En effet les doublets à 6.88 et 8, 06 ppm ($J = 7.1Hz$) d'intégration 2H chacun, sont attribuables à (H-3', H-5') et (H-2', H-6')

respectivement. Le spectre montre deux signaux à 6,17 et 6,39 ppm ($J = 1,5$ Hz) sous forme de deux singulets d'intégration 1H, attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement du noyau A. Les signaux des protons de la partie sucre apparaissent respectivement à 5.34 (H-1''), 2.91 (H-2''), 3.44 (H-3''), 3.32 (H-4''), 3.45 (H-5'').

-Le spectre RMN ^{13}C montre des signaux qui nous permet d'attribuer tous les carbones secondaires (CH) du squelette flavonol: 93.85 (C-8), 98.97 (C-6), 115.08 (CH-3',5') 130.94 (CH-2',6'). Les carbones de la partie sucre à 10 2.89 (C-1''), 71.11 (C-2''), 73.75(C-3''), 69.87 (C-4''), 76.59 (C-5''). La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles reportées dans la littérature laisse supposer que le glucose est attaché au carbone C-3 dans la mesure où le carbone C-3 et C-2 sont à 136,1 et 147,5 respectivement si le carbone C-3 est un porteur d'un OH libre, et à 132 et 159.5 si le carbone C-3 est substitué [44, 68,69].

Tab.4.85: Données spectrales RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé Ma_2E_2

Position	^1H			^{13}C		
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) DMSO-d6	δ (ppm) [70]	δ (ppm) [71]
2				159,3	146.8	159,3
3				133.2	136.5	135,1
4				177.32	175.9	179,4
5				161.16	160.7	163,0
5a				103.63	103.1	105,6
6	6,17	d	1.5	93,85	98.2	100,0
7				165.15	163.9	166,0
8	6,39	d	1.5	98.97	93.5	94,9
8a				156.50	156.2	158,5
1'				120.84	121.7	122,7
2'	8,06	d	7.1	130.94	129.5	132,2
3'	6.88	d	7.1	115.08	115.5	116,8
4'				159.08	159.2	161,6
5'	6.88	d	7.1	115.08	115.5	116,8
6'	8,06		7.1	130.94	129.5	132,2
1''	5.34	d		102.89		103,7
2''	2.91	m		71.11		74,1
3''				73.75		78,7
4''				69.87		70,1
5''				76.59		75,7
6''	4.06	m		67.15		64,1
1'''	3.77	d	6.5	130.68		130.77
2'''	3.95(2''-OH)	m		80.1		72.93
	2.84					116.2
3'''				159		73.27
						161.1
4'''						67.81
5'''	3.95(5''-OH)	m		80		76.59
	2.84					161.1
6'''	3.71(6''-OH)	d	3.0	72		60.88
	3.38					116.2

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé Ma_2E_2 .

Il s'agit de : Kaempférol-3-digalactopyranoside [44]

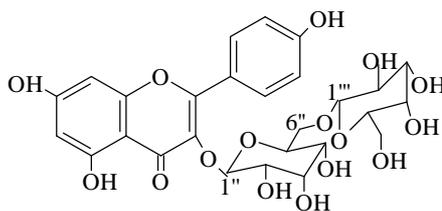


Fig.4.18: Structure de Kaempférol-3-digalactopyranoside

4.10. Le composé Zm_1C_1

- Poudre de couleur blanche
- $C_{15}H_{10}O_5$
- 270 g.mol^{-1}

Le composé Zm_1C_1 a été isolé sous forme d'une poudre de couleur blanche à partir de l'extrait chloroformique.

Tab.4.86 : Comportement chromatographique du composé Zm_1C_1

système	B/A/W (4/1/5)	$CHCl_3/MeOH$ (9/1)	$(CH_3)_2CO/H_2O$ (1/1)
R_f (fluorescence)	0.65 (pourpre sombre)	0.49 (pourpre sombre)	0.59 (pourpre sombre)

La couleur pourpre sombre sous 365 et le spectre UV présentant un maximum à 261 nm (bande II) et un épaulement à environ 330 nm (bande I) orientent vers une structure d'isoflavone [35,36]. Les données de la série spectrale UV (tableau 4.87) montrent: Le déplacement bathochrome (9nm) de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un OH libre en position 7. La stabilité du spectre enregistré après addition de NaOH avec le temps (5mn) comparativement à celui enregistré dans le MeOH, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B. Les déplacements bathochromes (42 nm et 13 nm) des bandes I et II respectivement, enregistrés après addition de $(AlCl_3+HCl)$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol, confirme la présence d'un OH libre en 5.

Tab.4.87: Données de la série spectrale UV du composé Zm_1C_1

réactifs	bande I $\lambda_{max}(nm)$	bande II $\lambda_{max}(nm)$	commentaires
MeOH	330	261	Isoflavones
MeOH + NaOH	321Ep	273	Pas de di-OH en B
MeOH + $AlCl_3+HCl$	372	274	OH libre en 5
MeOH + AcONa	325Ep	270	OH libre en 7
MeOH + AcONa + H_3BO_3	320 Ep	261	Pas de di-OH en B

-Le spectre IR (annexe A) montre une bande O-H au voisinage de 3459.18 cm^{-1} . La bande observée à 1629.14 cm^{-1} suggère un groupement carbonyle α,β insaturé. La bande d'absorption à 1022.76 cm^{-1} caractérise le groupement (C-O) d'un éther aliphatique.

La vibration à 623.98 cm^{-1} note la présence d'un cycle benzénique, une confirmation supplémentaire vient des bandes d'élongation des C-H aromatiques qui se situent à la limite des hautes fréquences des élongations des C-H aliphatiques.

Tab.4.88: Données spectrales IR (cm^{-1}) du composé Zm_1C_1

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	δ CH ₃	ν C-O	ν O-H .
Z m₁C₁	3459.18	2967.53 2918.39	1629.14	1416.08	1022.76	623.98

-Le spectre RMN-¹H (annexe A) présente un singulet à 13,00 ppm associé à un OH chélaté avec une fonction cétonique (en position 4). Un singulet d'intégration 1H à 8,15 ppm attribuable au proton en position 2 d'un isoflavonoïde. Deux doublets à 6,90 ppm et 7,45 ppm ($J=8,5$ Hz) intégrant chacun pour 2H, représentent les protons (H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement), ce ci indique une oxygénation en position 4'. L'absence d'autres signaux sur le spectre RMN ¹H laisse supposer la présence d'un OH libre en position 4'.

Deux doublets à 6,28 et 6,41 ($J=2,1$ Hz) ppm, intégrant chacun pour 1H, représentent les deux protons du cycle A (H-6 et H-8 respectivement).

-La série spectrale RMN¹³C montre des signaux à 153.2, 122.8, 99.1, 130 et 115.1 ppm qui sont attribuables aux carbonnes (C-2, C-3, C-6, C-2' et C-3') respectivement, pris comme exemples.

Tab.4.89: Données de la spectroscopie RMN ¹H et RMN ¹³C du composé Zm_1C_1

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C
	δ (ppm)	m		δ (ppm)
2	8,15	s		153,2
3				122,8
4				182,4
5	13,00(5-OH)	s		162,0
5a				104,4
6	6,28	d	2,1	94,1
7				164,7
8	6,41	d	2,1	99,1
8a				157, 1
1'				121,8
2'	7,45	d	8,5	130
3'	6,90	d	8,5	115,1
4'				158,9
5'	6,90	d	8,5	115,1
6'	7,45	d	8,5	130

Tous les résultats d'analyses précédents permettent d'identifier le composé Zm_1C_1 comme la 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone ou génistéine, ce que confirment les données de la littérature [72].

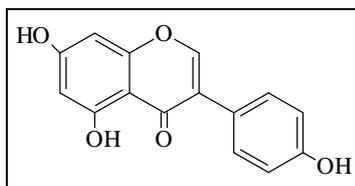


Fig. 4.19: Structure de 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (genisteine).

4.11. Le composé Zm_1C_2

- Poudre de couleur blanche obtenue à partir de l'extrait chloroformique.
- $C_{15}H_{10}O_5$
- 270 g.mol^{-1}

La pulvérisation du chromatogramme de gel de silice par une solution éthanolique d' $AlCl_3$ (1%), révèle l'apparition des taches jaunes, cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes.

Tab.4.90 : Comportement chromatographique du composé Zm_1C_2

système	BAW (4/1/5)	$CHCl_3/MeOH/H_2O$ (9/1/0.5)	$(CH_3)_2CO/H_2O$ (1/1)
Rf (fluorescence)	0.67 (violet)	0.39(violet)	0.49 (violet)

Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du Rf montre qu'il s'agit d'un aglycone. La fluorescence violette sous UV à 365nm nous laissent opter pour un flavone ou pour un flavonol substitué en 3[47].

-Les données de la série spectrale UV (tableau 4.91) montrent:

Le spectre méthanolique donne un maximum d'absorption à 336 nm pour la bande I et à 280 nm pour la bande II, ce qu' indique qu'il s'agit d'un flavone.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome (41 nm) de la bande I du spectre de NaOH par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en position 4'[40].

Tab.4.91 : Résultats de la spectroscopie UV du produit Zm_1C_2

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	commentaire
MeOH	336	280	/	Flavone
MeOH +NaOH	377	278	324	OH libre en 4', OH libre en 7
MeOH + $AlCl_3$	379	281	340 310	OH libre en 5
MeOH+ $AlCl_3$ +HCl	379	280	344 310	pas de di- OH sur le cycle B
MeOH + AcONa	336	286	324	OH libre en 7
MeOH+ AcONa / H_3BO_3	337	284	/	Pas de di- OH en C3' C4'

L'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm est révélateur de la présence d'un OH libre en position 7. Cet argument est confirmé par le déplacement bathochromique (6 nm) de la bande II après l'ajout du réactif AcONa. Le spectre méthanol en présence d'AlCl₃ présente un déplacement bathochrome (43 nm) de la bande I ce qui montre la présence d'un groupement (-OH) en position 5 [50]. L'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I, après comparaison des deux spectres AlCl₃ et (AlCl₃+HCl), indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di OH sur le cycle B. L'ajout de H₃BO₃ ne provoque qu'un très faible déplacement bathochromique (+1 nm) de la bande I ce qui témoigne l'absence du groupe di-OH en C3' C4'.

-Les spectres IR du composé *Zm₁C₂* montre les résultats suivants (Tableau 4.92): La présence du groupement hydroxyle est confirmée par la bande large apparaît à 3355.39 cm⁻¹. Un signal caractéristique de la bande d'absorption du groupement carbonyle (1634.60 cm⁻¹).

Tab.4.92 : Données spectrales IR(Cm⁻¹) du composé *Zm₁C₂*

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Z m₁C₂	3355.39	2962.06 2923.82	1634.60	1514.42	1416.08	1284.98	1071.93	662.22

-Une autre bande apparaît à 1514.42 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation de C=C aromatique. La fréquence d'absorption observée à 1284.98 cm⁻¹ indique la présence d'un ether conjugué, ainsi que la bande située à 1071.93 cm⁻¹ suggère un ether aliphatique. La déformation de CH aromatique apparaît à 662.22 cm⁻¹ correspond à la présence d'un noyau benzénique.

La déformation de groupement CH₂ apparaît à 935.36cm⁻¹, ainsi que les bandes d'absorption au voisinage de 2852.81 et 2962.06 cm⁻¹ sont caractéristiques des vibrations d'élongation d'un CH, indique la présence de glycoside [51,73].

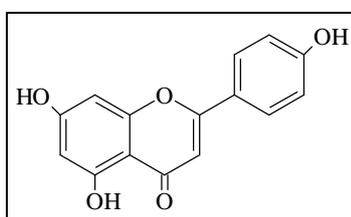
-L'examen du spectre RMN ¹H (annexe) montre: Un singulet à 6, 59 ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone. Deux singulets d'intégration 1H chacun, le premier à 6,42ppm, le second à 6, 23 ppm attribuables à H-8 et H-6 respectivement. Un signal à 7,70 ppm qui apparaît sous forme de doublet ($J = 8,6$ Hz) d'intégration 2H, permet l'attribution de ce signal à H-2' et H-6'. Un signal à 6,91 ppm qui apparaît sous forme de doublet ($J = 8,6$ Hz) d'intégration 2H, permet l'attribution de ce signal à H-3' et H-5'. L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau suivant (Tab.4.93):

Tab.4.93 : Données de la RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé Zm_1C_2

Position	^1H		J (Hz)	^{13}C	
	δ (ppm)	m		δ (ppm)	δ (ppm) [73]
2				165.3	164.1
3	6,59	s		103.8	102.8
4				183.1	181.8
5				162.6	161.1
5a				104.9	103.7
6	6.23	s		194.78	94
7				165.3	163.8
8	6,42	s		99.7	98.8
8a				158.8	157.3
1'				122.7	121.3
2'	7,70	d	8,6	129.2	128.4
3'	6,91	d	8,6	116.8	116
4'				162.2	161.5
5'	6,91	d	8,6	116.8	116
6'	7,70	d	8,6	129.2	128.4

Le spectre de masse montre un ion pseudo moléculaire à m/z 271 correspondant au pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]$ proposant une structure d'un flavonoïde non glycosylé. La présence des ions à m/z 119,145 et 153 montre qu'il s'agit d'un flavone contenant deux groupes hydroxyls sur le cycle A et un autre sur le cycle B [74].

Ces données spectrales montrent que le composé est la: 4', 5, 7-trihydroxyflavone connu sous le nom d'Apigénine (Fig.4.20).

**Fig.4.20:** Structure de 4', 5, 7-trihydroxyflavone (Apigénine)

4.12. Le composé Zm_1Ac_1

- Cristaux de couleur blanche
- $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$
- $314 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le composé Zm_1Ac_1 a été isolé sous forme de cristaux blancs à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Tab.4.94 : Comportement chromatographique du composé Zm_1Ac_1

système	BAW (4/1/5)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1/0.5)	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1)
Rf (fluorescence)	0.56 (bleu blanc)	0.15(violet)	0.49 (violet)

Le comportement chromatographique et la valeur du maximum d'adsorption de la bande I à 320 nm et de la bande II à 270 nm du spectre UV-visible enregistré dans le méthanol, montrent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone [35].

Tab.4.95: Données spectrales UV du composé Zm_1Ac_1

Réactif	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	commentaire
MeOH	320	270		Flavone
MeOH + NaOH	372	210	326	OH libre en 7
MeOH + AlCl ₃	360	282	310	OH libre en 5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	360.5	282	308	Pas de di-OH en cycle B
MeOH + AcONa	346	279	326	OH libre en 7
MeOH + AcONa + H ₃ BO ₃	321.5	276	-	Pas de di- OH en cycle B

-Le spectre UV du méthanol additionné de NaOH présente un déplacement bathochrome (52 nm) de la bande I par rapport au spectre méthanol, ce qui montre la substitution de la position 4'[40]. Le spectre du méthanol additionné d'AlCl₃ présente un déplacement bathochrome (40 nm) de la bande I par rapport au spectre de méthanol, ce qui favorise la présence d'un OH en position 5[50]. Le spectre (MeOH + AlCl₃ + HCl) ne présente pas un effet hypsochrome de la bande I par rapport au spectre (MeOH + AlCl₃), ce qui prévoit l'absence d'un système orthodihydroxylé sur les noyaux A et B.

Le spectre (MeOH + AcONa) présente un déplacement (+9nm) de la bande II par rapport au spectre méthanol et l'apparition d'une nouvelle bande à 326 nm, ce qui argumente la présence d'un OH libre en position 7. L'absence du groupe ortho di-OH en C4' est confirmée par le très faible déplacement bathochromique (+1.5) de la bande I après l'ajout de H₃BO₃ au (MeOH + AcONa).

Tabl.4.96 : Données spectrales IR(cm^{-1}) du composé Zm_1Ac_1

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Z m₁Ac₁	3410.02	2967.53 2934.75 2858.27	1629.14	1508.95	1416.08 1459.79	1257.66	1104.70 1055.54 1028.22	667.68

-Le spectre RMN ¹H montre: Un signal à 12.62 ppm sous forme d'un singulet caractérisant la fonction OH en position 5.

Tab.4.97 : Données de la spectroscopie RMN ¹H et RMN ¹³C du composé Zm₁Ac₁

Position	¹ H		J (Hz)	¹³ C	
	δ (ppm)	m		δ (ppm)	δ (ppm)DMSO-d ₆ [54]
2	-		-	162.9	163
3	6.86	s		103.1	103
4				181.3	182
5	12.62 (OH-C5)	s		156.2	156
5a	-		-	103.7	104
6	6.28	s		98,1	98.9
7	-		-	157.1	157
8				127.8	128
8a	-		-	148.8	149
1'	-		-	122.9	123
2'	7,88	d	8,7	128.6	128
3'	7.13	d	8,7	114	115
4'	-		-	162.3	162
5'	7.13	d	8,7	114	115
6'	7,88	d	8,7	128.6	128
OCH ₃ -C8	3.85		-	58.3	
OCH ₃ -C-4'	3.85		-	53.4	

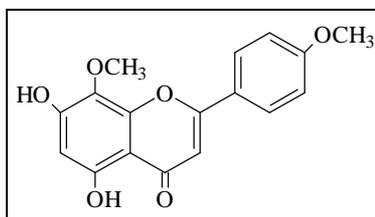
Un singulet à 6,28ppm d'intégration 1H attribuable à H-6. Un singulet à 3,85 ppm d'intégration 6 H, correspondant à deux groupements méthoxy. Le signal à 6,86 ppm, sous forme d'un singulet, correspond à H-3.

Le signal à 7,13 ppm ($J = 8,7$ Hz) sous forme de doublet d'intégration 2H est attribué aux protons H-3' et H-5'; La meme constante de couplage qui apparaît à 7,88 ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.

-Le spectre RMN du ¹³C (annexe---), indique la présence de deux méthoxyles, confirmée par les carbones situés à 53.4 et 58.3 ppm.

Nous distinguons des CH aromatiques (à 98.1, à 128.6 et à 114ppm) et un groupe carbonyle à 181.3 ppm. La présence du carbone-3 caractéristique d'un flavone (103.1 ppm) [75].

Ainsi, l'ensemble des données UV-visible et RMN permettent de définir le composé Zm₁Ac₁ comme étant le 8, 4' -diméthoxy, 5,7-dihydroxyflavone[76].

**Fig.4.21:** Structure de 8,4' -diméthoxy,5,7-dihydroxyflavone.

4.13. Le composé Zm_1Ac_2 - $C_{22}H_{20}O_{11}$ -460g.mol⁻¹**Tab.4.98** : Comportement chromatographique du composé Zm_1Ac_2

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (9/1/0.5)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.86 (rouge)	0.77(mauve)	0.40 (rouge)

Le maximum d'absorption de la bande I à 332 nm et le comportement chromatographique (fluorescence sous la lumière UV (365 nm) et R_f) indiquent que le composé est un flavone ou un flavonol (hétéroside monoglycosylé).

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome (52 nm) de la bande I indique la présence d'un OH libre en 4'; l'absence d'une nouvelle bande indique une substitution de la position 7.

Le spectre de (MeOH+AlCl₃) montre un déplacement bathochrome (43 nm) de la bande I, comparativement à celui enregistré dans le méthanol, confirmant la présence d'un OH libre en 5.

Tab.4.99 : Données de la spectroscopie UV du composé Zm_1Ac_2

Réactif	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	commentaire
MeOH	332	270		Flavone
MeOH + NaOH	384	273		OH libre en 4', Substitution en 7
MeOH + AlCl ₃	375	271	310	OH libre en 5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	375.5	272	308	Pas de di- OH en cycleB
MeOH + AcONa	372	278	-	Substitution en 7
MeOH+ AcONa +H ₃ BO ₃	334	278	-	Pas de di-OH en C3' C4'

En comparant le spectre (AlCl₃+ HCl) avec celui d'AlCl₃, on remarque un faible déplacement de la bande I, ce qui laisse prévoir l'absence d'un système orthodihydroxylé sur le cycle B. Le spectre (MeOH + AcONa) présente un déplacement bathochrome (8 nm) de la bande II par rapport au spectre méthanol, ce qui montre la substitution de la position 7. Le spectre (MeOH + AcONa +H₃BO₃) montre un très faible déplacement bathochromique (2nm) de la bande I, ce qui confirme l'absence du groupe di-OH en C3' C4'.

Tab.4.100 : Données spectrales IR(cm^{-1}) du composé Zm_1Ac_2

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	ν C-O	δ =C-H arom.
Z m₁Ac₂	3610.24	2920.24	1699.55	1541.92	1457	1098.65	800.32

-L'examen du spectre de RMN ^1H (Tabl.4.101) montre la présence de:

Deux doublets d'intégration 1H chacun, à 6,5 et à 6,23 ppm ($J = 2,2$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement. Deux doublets à 7,90 ppm et à 7,05 ppm d'intégration 2H chacun ($J = 8,8$ Hz), attribuables à (H-2', H-6') et (H-3', H-5') respectivement, indiquant ainsi une oxygénation du noyau B en position 4' d'un flavonoïde[68]. Un singulet à 13 ppm, attribuable à un OH en C-5. Un signal à 6,72 ppm sous forme d'un singulet, d'intégration 1H attribuable au H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone.

Un singulet à 3,69ppm, attribuable à un groupement methoxyle. Un doublet à 5,30 ppm ($J = 7,3$ Hz), attribuable au proton d'un sucre(en position 7) lié par une liaison C-O, car toutes les autres positions sont occupées par des protons . Trois doublets d'intégration 1H chacun à 4,87 ppm ($J = 4,0$ Hz), 4,63 ppm ($J = 4,8$ Hz) et 4,60 ppm ($J = 4,0$ Hz). Un triplet de doublets d'intégration 1H à 3,59 ppm ($J = 8,9\text{Hz}$) et de deux multiplets à 3,58 ppm ($J = 7,2$ Hz) et à 3,70 ppm ($J = 4,8$ Hz).

Tab.4.101: Résultats RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé Zm_1Ac_2

Position	^1H		J (Hz)	^{13}C	
	δ (ppm)	m		δ (ppm)	
2					165,6
3	6,72	s	-		104,4
4					183,3
5	13 (OH-5)	s	-		162,1
5a					106,9
6	6,23	d	2,2		95,6
7					163,9
8	6,5	d	2,2		100,4
8a					158,4
1'	5,36	d	7,4		123,2
2'	7,90	d	8,8		129,4
3'	7,05	d	8,8		116,9
4'					163,1
5'	7,05	d	8,8		116,9
6'	7,90	d	8,8		129,4
1''	5,30 (H1'' sucre)	d	7,3		101,1
2''	3,58 (H-2'')	m	7,2		74,2
	4,87 (OH-2'')	d	4,0		
3''	3,59 (H-3'')	td	8,9		77,0
	4,60(OH-3'')	d	4,0		
4''	3,70(H-4'')	m	4,8		72,6
	4,63 (OH-4'')	d	4,8		
5''	4,25	d	9,4		76,5
-OCH 3	3,69	s	-		52,5

D'après les valeurs des constantes de couplage, il apparait que ces signaux sont attribuables aux trois protons des trois groupements CH porteurs des trois hydroxyles. Un doublet à 4,25 ppm ($J = 9,4$ Hz), d'intégration 1H. D'après les résultats précédents, ce CH doit faire partie du sucre.

-L'examen du spectre RMN ^{13}C révèle la présence d'un groupement CH_2OH à 59,2 ppm, orientant ainsi vers un substituant de type glucosyle.

Toutes ces données nous mènent à dire que le composé est 4', 5-dihydroxy 7-O-glucosylflavone connu sous le nom de 7-O-glucosyl apigénine ou 7-(6''-methylglucuronyl) apigénine [77].

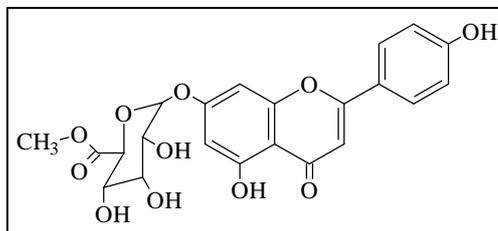


Fig.4.22: Structure de 7-(6''-methylglucuronyl) apigénine

4.14. Le composé Zm_1Ac_3

$-\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_8$

$-399 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le composé Zm_1Ac_3 se présente sous forme d'une poudre blanche, il a été isolé de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Tab.4.102: Comportement chromatographique du composé Zm_1Ac_3

système	BAW (4/1/5)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1)	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1)
Rf (fluorescence)	0.67 (rouge)	0.43 (rouge)	0.54 (rouge)

Le comportement chromatographique (le Rf et la couleur pourpre sombre sous 365) et le spectre UV présentant un maximum à 260 nm (bande II) et un épaulement à environ 310 nm (bande I) orientent vers une structure d'isoflavone[35,47].

La série spectrale UV (tableau 4.103) donne les indications suivantes :

Tab.4.103: Données de la série spectrale UV du composé Zm_1Ac_3

réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	310	260		isoflavone
MeOH +NaOH	363	260	325	OH libre en C4' OH libre en C7
MeOH +AlCl ₃	344	263		OH libre en 5
MeOH+AlCl ₃ +HCl	314	271	360	di-OH sur le cycle B
MeOH +AcONa	340	267	325	OH libre en 7
MeOH+ AcONa +H ₃ BO ₃	321	267	325	di-OH sur le cycle B

Le spectre méthanol en présence de AlCl_3 présente un déplacement bathochrome de la bande I (+ 34 nm) ce qui montre la présence d'un groupement (-OH) en position 5 [50].

Les déplacements bathochromes (+ 40 nm et + 11nm) des bandes I et II respectivement, enregistrés après addition de AlCl_3+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5.

Le déplacement bathochromique (+53 nm) et hyperchromique de la bande I suite à l'addition de NaOH, et l'apparition d'une nouvelle bande à 325nm indiquent respectivement la présence d'un OH libre en C4' et un autre en C7.

Les comparaisons suivantes: $\text{AlCl}_3+\text{HCl}/\text{AlCl}_3$ et $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ résultent respectivement d'un effet hypsochromique (-30nm) et bathochromique +34 nm) de la bande I ce qui nous informe sur la présence d'un groupe ortho dihydroxy en C3' C4' et sur la présence d'un OH libre en C5.

L'addition de AcONa provoquant un déplacement bathochrome de la bande II (+7nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.

La comparaison du spectre AcONa + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH résulte d'un effet bathochromique de la bande I (+11nm), ce qui nous informe sur la présence d'un groupe ortho di-OH en C3'C4'.

-Le spectre IR de ce composé indique la présence de plusieurs bandes d'absorption : une bande d'absorption de vibration de valence à 3432 cm^{-1} , caractéristique de la liaison O-H d'un alcool associé; la présence d'une bande OH est confirmée par les vibrations de déformation de OH à 1383 cm^{-1} . L'absorption provenant des élongations des hydrocarbures saturés contenant des groupes méthyles symétriques et asymétriques donne des bandes à 2956 et 2853 cm^{-1} .

Tab.4.104: Données spectrales IR (cm^{-1}) du composé Zm_1Ac_3

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Z m₁Ac₃	3432	3055 2956 2918 2853	1733	1596	1492 1449	1383	1066	749

La bande de cisaillement CH₃ asymétrique ou symétrique apparaît à une position presque fixe vers 1492 cm^{-1} .

Des groupes méthylènes CH présentent une bande assez intense vers 2918 cm^{-1} confirmée par la bande de déformation à une position presque fixée à 1449 cm^{-1} .

La valeur de 1383 cm^{-1} correspond aux vibrations d'un groupement tertio butyle >CH- ; une vibration d'élongation à 1733 cm^{-1} du groupe C=O d'un ester saturé apparaît sous forme de bande étroite et intense.

-Le spectre RMN¹H du composé indique les signaux suivants : Un signal à 0,77 ppm sous forme d'un doublet d'intégration 3H correspondant au groupement méthylique 6''-CH₃. Trois signaux à 1.35, 1.36 et 1.21 ppm, sous forme de triplet et deux quadruplets, d'intégration 2H chacun, attribuables aux protons H-2'', H-5'' et H-4'' respectivement.

4.15. Le composé Zm_1B_1 - $C_{21}H_{21}O_8$ - 401 g.mol⁻¹Le composé Zm_1B_1 a été isolé de l'extrait butanolique.**Tab.4.106:** Comportement chromatographique du composé Zm_1B_1

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (9/1/0.5)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.65 (bleu blanc)	0.39(violet)	0.46 (violet)

Le maximum d'absorption à 321 nm pour la bande I et 285 nm pour la bande II, ainsi que le comportement chromatographique (fluorescence sous UV à 365 nm et R_f) nous laissent opter pour un flavone dont le noyau A est substitué.

-Le spectre (MeOH +NaOH) montre un déplacement bathochromique (53nm) de la bande I et une nouvelle bande à 327 nm, indiquant la présence d'un OH libre en C4' et un autre en C7 respectivement(tableau 4.107).

Tab.4.107: Données de la série spectrale UV du composé Zm_1B_1

réactifs	Bande I λ _{max} (nm)	BandeII λ _{max} (nm)	Autres bandes	commentaires
MeOH	321	285	250	Flavone
MeOH +NaOH	374	267	327	OH libre en 4' OH libre en 7
MeOH +AlCl ₃	355	273	-	OH libre en 5 et di-OH sur le cycle B
MeOH +AlCl ₃ /HCl	325	274	360 297	
MeOH + AcONa	382	290	248	OH libre en 7
MeOH+ AcONa +H ₃ BO ₃	331	269	/	di-OH sur le cycle B

Les comparaisons suivantes: AlCl₃+HCl/AlCl₃ et AlCl₃/ MeOH résultent respectivement d'un effet hypsochromique (-30nm) et bathochromique (34 nm) de la bande I, ce qui nous informe sur la présence d'un groupe ortho dihydroxy en C3' C4' et sur la présence d'un OH libre en C5.

L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II (5 nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.

La comparaison du spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport à celui de MeOH résulte d'un effet bathochromique (10nm) de la bande I, ce qui nous informe sur la présence d'un groupe di-OH en C3'C4'.

Tab.4.108 : Données spectrales IR(cm⁻¹) du composé Zm_1B_1

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ O-H	ν C-O	δ =C-H arom.
Z m₁B₁	3502.71	2963.41	1641.33	1542	1261.37	1096.11	802.09

-L'examen du spectre RMN ¹H montre: Un signal à 6,50 ppm (J = 2.1 Hz) sous forme d'un singulet d'intégration 1H attribuable à H-8. Un singulet à 6,53 ppm d'intégration 1H attribuable

à H-3, ce qui permet d'opter pour une structure de type flavones. Un autre signal à 6,20 ppm ($J = 2,1$ Hz) sous forme de singulet d'intégration 1H attribuable à H-6, confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du cycle A. Le signal qui apparaît à 6,98 ppm ($J = 8,2$ Hz) sous forme d'un doublet, est attribuable à H-5'. Le signal à 7,40 ppm ($J = 2,1$ Hz) d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6', confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B [78,79].

Tab.4.109: Données de la RMN 1H et RMN ^{13}C du composé Zm_1B_1

Position	1H		J (Hz)	^{13}C	
	δ (ppm)	m		δ (ppm) DMSO	δ (ppm) (CD ₃ OD) [78]
2				163.9	165.4
3	6,53	s		102.5	103.9
4				182.5	183.1
5				161.8	162.7
5a				103.9	105
6	6.20	d	2,1	98.7	94.75
7				164.8	165.3
8	6,50	d	2,1	93.6	99.74
8a				158	158.8
1'				122.3	123.2
2'	7,40	d	2,1	112.8	114
3'				145.6	146.7
4'				149.6	150.5
5'	6,98	d	8,2	115.4	116.7
6'	7,40	d	2,1	118.9	120

Toutes ces données permettent de dire que le composé Zm_1B_1 correspond à: 3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone connu sous le nom de lutéoline.

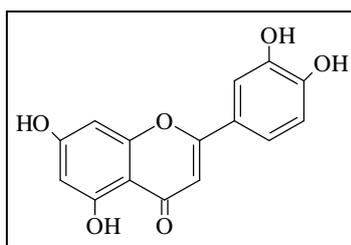


Fig.4.24: structure du composé 3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone (lutéoline).

4.16. Le composé Zm_2Ac_1

-C₃₄H₄₄O₉

- 596 g.mol⁻¹

Le composé Zm_2Ac_1 est isolé sous forme de poudre marron soluble dans le méthanol et le chloroforme.

Tab.4.110 : Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_1

système	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH (9/1)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)
R _f (fluorescence)	0.67 (bleu)	0.17(violet)	0.45 (violet)

Le comportement chromatographique (le R_f et la couleur pourpre sombre sous 365) et le spectre UV (méthanol) présentant un maximum à 270 nm (bande II) et une autre à 314 nm (bande I) orientent vers une structure de flavone [35, 40].

Tab.4.111 : Données de la série spectrale UV du composé Zm_2Ac_1

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Commentaire
MeOH	314	270	flavone
MeOH +NaOH	339	285	substitution en C4' et en C7
MeOH +AlCl ₃	341	281	OH libre en 5 pas de di- OH Sur le cycle B
MeOH+AlCl ₃ +HCl	341	281	
MeOH +NaOAc	324	278	OH libre en 7
MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	315		pas de di- OH Sur le cycle B

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I (+ 25 nm) indique la substitution de la position 4', l'absence d'une nouvelle bande indique une substitution de la position 7.

Le spectre méthanol en présence de AlCl₃ présente un déplacement bathochrome de la bande I de 27nm ce qui montre la présence d'un groupement (-OH) en position 5.

L'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I après comparaison des deux spectres AlCl₃ / (AlCl₃+HCl) indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di-OH sur le cycle B.

Le spectre méthanol après addition de NaOAc présente un déplacement de la bande II par rapport au spectre méthanol (8 nm) ce qui montre la substitution de la position 7. Puis l'ajout de H₃BO₃ ne provoque qu'un très faible déplacement bathochromique (+1) de la bande I, ce qui témoigne l'absence du groupe OH en C3' C4'.

- Le spectre IR du produit isolé nous donne une première série d'informations concernant sa structure, les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence de fonction ou des groupements spécifiques tels que : des groupes portant des liaisons CH (CH, CH₂, CH₃) ainsi que la présence d'un groupement (C=O) et d'une fonction (C=C). Ces bandes d'absorption sont les suivantes: les vibrations d'élongation de la liaison CH entre 3000 et 2840 cm^{-1} , la bande d'absorption (CH₂) 2852 cm^{-1} , les vibrations de déformation dans le plan des liaisons (CH₂) 1421 cm^{-1} , et une bande d'absorption de vibration de valence, caractéristique de la liaison O-H d'un alcool associé ; sous forme d'une bande large et intense à 3443 cm^{-1}

Tab.4.112: Données spectrales IR(cm^{-1}) du composé Zm_2Ac_1

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O
Z m₂Ac₁	3443	2929 2852	1684	1591	1421	1230	1033

-L'examen du spectre RMN¹H (annexe A, Tableau.4.113) montre: Un signal à 7,20 ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au proton H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone. Deux autres signaux sous forme de doublets d'intégration 1H chacun et dont la constante de couplage $J = 8,8$ Hz, le premier à 6,90 ppm, attribuable à H-2', et l'autre à 6,78 ppm, permet son attribution à H-6', indiquant ainsi une oxygénation du noyau B en position 4' d'un flavonoïde [35].

Des signaux à 3.81, 3.79, 3.82, 3.84 ppm, attribuables aux groupements méthoxyles en positions 4', 5', 6 et 8 respectivement.

Tab.4.113: Données spectrales RMN¹H et RMN¹³C du composé Zm₂Ac₁

Position	¹ H			¹³ C
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) CDCl ₃
2	-		-	153.4
3	7.20	s		134.2
4				182
5	12.59 OH-C5	s		146.6
5a	-		-	102.7
6				126.97
7	-		-	159.6
8				128.53
8a	-		-	149
1'	-		-	119.06
2'	6,90	d	8,8	114.23
3'				128.1
4'	-		-	162.3
6'	6,78	d	8,8	117.5
C4'-OMe	3.81	s	-	58.4
C5'-OMe	3.79	s		60.54
C6-OMe	3.82	s		55.99
C8-OMe	3.84	s		56.26
1''	5,27			86.9
2''	6,56			118.7

Ainsi, l'ensemble des données UV-visible et RMN permettent de définir le composé Zm₂Ac₁ comme étant le 5,3'-dihydroxy-6,8,4',5'-tetraméthoxy-7-[2''(4''''-méthylpentyl) cyclohexyl] vinyloxy] flavone

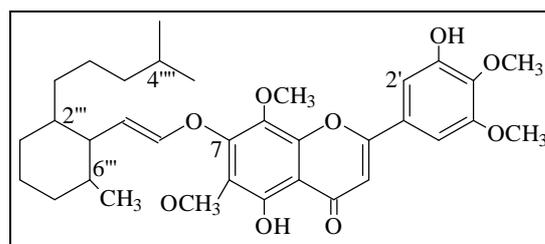


Fig.4.25: structure de 5,3'-dihydroxy-6,8,4',5'-tetraméthoxy-7-[2''(4''''-méthyl pentyl)6''-méthyl- cyclohexyl]vinyloxy]flavone

4.17. Le composé Zm_2Ac_2 - $C_{15}H_{10}O_4$ (poudre jaune)-254 $g.mol^{-1}$ **Tab.4.114:** Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_2

Système	BAW (4 : 1 : 5)	H ₂ O : MeOH : (CH ₃) ₂ CO (1 : 3 : 3)	(CH ₃) ₂ CO : H ₂ O (1 : 1)
Rf (fluorescence)	0.60 (violet)	0.93 (violet)	0.49 (violet)

Le produit Zm_2Ac_2 donne une tache de couleur violette sous lumière UV (365 nm) suggérant une structure de flavonoïde.

Tab.4.115: Données de la série spectrale UV du composé Zm_2Ac_2

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes $\lambda_{max}(nm)$	Commentaires
MeOH	320	270	250	Flavone
MeOH + NaOH	367	279	233	OH libre en C5 et C7
Après 5 mn	367	278	233	Pas de OH sur B
MeOH + AlCl ₃	359,330	282	254	OH libre en 5
MeOH + AlCl ₃ /HCl	357,328	281	254	Pas de di-OH en B
MeOH + AcONa	342	278		OH libre en 7
MeOH + AcONa + H ₃ BO ₃	320	275	/	Pas de di-OH en B

Le spectre UV dans le méthanol donne une bande à 320 nm relatif d'une flavone, additionné de NaOH montre un déplacement bathochrome de 47 nm et l'apparition d'une nouvelle bande à 233 nm indiquant respectivement des hydroxyles libres en C5 et C7. La comparaison du spectre NaOAc par rapport au spectre MeOH montre un déplacement bathochrome de 22 nm confirmant la présence d'un OH libre en C7.

La comparaison du spectre AcONa + H₃BO₃/ MeOH ne donne aucun effet, cela peut être due à l'absence du groupe di-OH en C3' C4'.

Le spectre UV dans le méthanol additionné d'AlCl₃ montre un déplacement bathochrome de 39 nm et un dédoublement des bande I et II indiquant un OH libre en C5.

La comparaison des spectres AlCl₃+HCl / AlCl₃ montre un faible déplacement hypsochromique (- 2nm), ce qui confirme l'absence du groupe OH en C3' C4'[40].

Tab.4.116: Données spectrales IR (Cm^{-1}) du composé Zm_2Ac_2

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ O-H	ν C-O
Z m₂Ac₂	3367.36	2934.14	1654.33	1607.91 1508.24	1384.52	1070.56

-Le spectre RMN ¹H montre: Un signal à 6.45 ppm attribué à H3; deux doublets à 6.10 et 6.3 ppm avec une constante de couplage de 2,2 Hz, relatif aux protons (H6 et H8). Un multiplet à

7.30 ppm et un signal à 7.72 ppm sous forme de doublet dedoublé, soit quatre protons (2', 3', 5' et 6') indiquant que le noyau B est non substitué [51].

Tab.4.117: Données de la série spectrale RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé Zm_2Ac_2

Position	^1H		J (Hz)	^{13}C
	δ (ppm) CDCl_3	m		δ (ppm) DMSO
2				164.4
3	6.45	s		105.1
4				181.9
5				161.4
5a				104
6	6.10	d	2.2	98.9
7				163.2
8	6.30	d	2.2	94.1
8a				157.4
1'				130.7
2'	7.72	dd	8.4	126.4
3'	7.30	m		129.1
4'	7.42	m		132
5'	7.30	m		129.1
6'	7.72	dd	8.4	126.4

-Le spectre de masse montre un pic à m/z 252.7 correspondant au pic moléculaire M-H, proposant la structure d'un flavone di-hydroxylé [53].

L'ensemble des données précédentes nous mène à identifier Zm_2Ac_2 à 5,7-dihydroxyflavone (chry sine) [80].

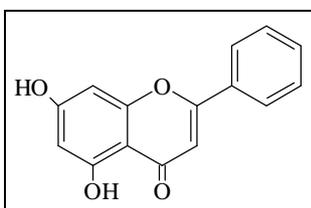


Fig. 4.26: Structure de 5,7-dihydroxyflavone (chry sine)

4.18. Le composé Zm_2Ac_3

$-\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$

$-542 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le composé Zm_2Ac_3 est isolé sous forme d'un solide jaune, par l'acétate d'éthyle

Tab.4.118: Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_3

système	BAW (4/1/5)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1/0.5)	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1)
R_f (fluorescence)	0.75 (bleue)	0.18 (bleue)	0.35 (bleue)

Le comportement chromatographique (le R_f et la couleur bleue sous 365) et le spectre UV présentant un maximum à 288 nm (bande II) et une autre à 315nm (bande I) orientent vers une structure d'un flavonol.

Tab.4.119 : Données de la série spectrale UV du composé Zm_2Ac_3

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes	Commentaire
MeOH	315	288		Flavonol
MeOH +NaOH	329	296	329	OH libre en 4' OH libre en 7
MeOH +AlCl ₃	335	295		OH libre en 5
MeOH+AlCl ₃ +HCl	315	295	345	di-OH sur le cycle B
MeOH + AcONa	326	298	248	OH libre en 7
MeOH+ AcONa /H ₃ BO ₃	325			di-OH sur le cycle B

Les données de la série spectrale UV (tableau 4.119) montrent:

Le déplacement bathochromique (+14nm) et hyperchromique de la bande I suite à l'addition de NaOH, et l'apparition d'une nouvelle bande à 329 nm indiquent respectivement la présence d'un OH libre en C-4' et un autre en C-7.

Les comparaisons suivantes: AlCl₃+HCl/AlCl₃ et AlCl₃/ MeOH résultent respectivement d'un effet hypsochromique (-20 nm) et bathochromique +20 nm) de la bande I ce qui nous informe sur la présence de deux groupes hydroxy en cycle B et sur la présence d'un OH libre en C5.

L'addition de AcONa provoquant un déplacement bathochrome de la bande II (+ 10 nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7. La comparaison du spectre AcONa + H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH résulte d'un effet bathochromique de la bande I (+10nm) ce qui nous informe sur la présence de deux groupes OH en cycle B.

Tab.4.120 : Données spectrales IR(Cm^{-1}) du composé Zm_2Ac_3

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Z m₂Ac₃	3460	2962 2874	1727	1602	1460	1285	1121	700

- Les vibrations d'élongation de la liaison CH entre 3000 et 2840 cm^{-1} , la bande d'absorption (CH₂) 2874 cm^{-1} , les vibrations de déformation dans le plan des liaisons (CH₂) 1460 cm^{-1} , et une bande d'absorption de vibration de valence, caractéristique de la liaison O-H d'un alcool associé ; sous forme d'une bande large et intense à 3460 Cm^{-1} et une bande d'absorption intense à 1727 cm^{-1} caractéristique d'une fonction carbonyle C=O. plus une absorption à 1602 cm^{-1} caractéristique d'une double liaison C=C et (C-C) à 1285 cm^{-1}

-L'étude du spectre RMN ¹H donne les indications suivantes: Un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à 12,45 ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5 du cycle A.

Tab.4.122: Comportement chromatographique du composé Zm_2Ac_4

Système	BAW (4 :1 :5)	H ₂ O /MeOH / CH ₃ Cl (0.5 : 1 :9)	(CH ₃) ₂ CO /H ₂ O (1 :1)
Rf (fluorescence)	0.41 (jaune)	0.11 (jaune)	0.79 (jaune)

Le rapport frontal et la fluorescence jaune sous lumière de Wood laissent envisager la structure d'une flavone substituée 3-R.

L'examen de la série spectrale UV (Tableau 4.123) montre: La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 325 nm et de la bande II à 280nm, est en faveur d'une structure de type flavone substituée en C-3 [35].

Tab.4.123: Données de la série spectrale UV du composé Zm_2Ac_4

réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	commentaires
MeOH	325	280	Flavone (3-R)
MeOH +NaOH	355	263, 283	4' – OR et 7 - OH
MeOH +AlCl ₃	331	263	OH libre en 5 et 3-R une oxygénation en C-6 Pas de di-OH sur le cycle B
MeOH + AlCl ₃ +HCl	331	263	
MeOH + AcONa	350	288	OH libre en 7
MeOH+ AcONa +H ₃ BO ₃	325	276	Pas de di-OH sur le cycle B

L'ajout de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I comparativement à celui enregistré dans le MeOH (+ 30 nm) avec une augmentation de l'intensité, révèle la présence d'une substitution en C-4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 263 nm confirme un OH libre en C-7.

L'addition d'AlCl₃ donne un déplacement bathochrome de la bande I, la persistance de cet effet après acidification par HCl indique un OH libre en C5, une substitution en C-3 et une oxygénation en C-6. Cet effet confirme aussi, l'absence du groupe ortho di OH en C-3' C-4'[40].

La comparaison du spectre AcONa par rapport au spectre MeOH montre un déplacement bathochrome (+8 nm) de la bande II confirmant la présence d'un OH libre en C-7

La comparaison du spectre AcONa + H₃BO₃/ MeOH ne donne aucun effet, cela confirme l'absence de deux groupes OH en C3' C4'[40].

Tab.4.124: Données spectrales IR(Cm^{-1}) du composé Zm_2Ac_4

	ν O-H arom.	ν C-H aliph	ν C=O	ν C=C arom.	δ CH ₃	δ O-H	ν C-O	ν O-H
Z m₂Ac₄	3426 3066	2956	1727	1662	1465	1274	1072	706

Les bandes d'absorption sont les suivantes : les vibrations d'élongation de la liaison CH à 2956 et 2853 cm^{-1} , les vibrations de déformation dans le plan des liaisons δ (CH_2) 1465 cm^{-1} , et une bande d'absorption intense à 1727 cm^{-1} caractéristique d'une fonction carbonyle C=O.

Le spectre IR présente l'absorption de vibration de valence, caractéristique de la liaison O-H d'un alcool associé ; sous forme d'une bande large et intense à 3426 cm^{-1} plus une absorption à 1662 cm^{-1} caractéristique d'une double liaison C=C.

-L'étude du spectre RMN ^1H donne les indications suivantes (Tab.4.125):

Un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à 12,25 ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5 du cycle A. Un singulet à 7.44 ppm d'intégration 1H attribuable à H-2'. Un singulet à 7.45 ppm d'intégration 1H, attribuable à H-6'. Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une trisubstitution du noyau B. Un singulet d'intégration 3H à 3.82 ppm attribuable à un groupement méthoxyle (4'-OCH₃). Des signaux entre 0,78 et 1,64 ppm caractérisant les protons des carbones aliphatiques. Deux signaux sous forme de doublets dédoublés d'intégration 1H chacun à 7, 63 et 7, 46 ppm attribuables aux protons (H-2'', H6'') et (H-3'', H-5''). Deux signaux à 3,825 et 3,835 sous forme de singulets d'intégration 2H chacun, attribuables aux protons 1'''' et 1'''''.

Tab.4.125: Données spectrales RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé Zm_2Ac_4

Position	^1H			^{13}C
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm) CDCl_3
2	-			158,9
3	-			131,9
4	-			176
5	12,25			152,2
5a	-			102,9
6	-			130
7	-			157,0
8	-			131,0
8a	-			144,9
1'	-			131,44
2'	7,44	s		129,86
3'	-			146,2
4'	-			147,2
5'	-			115,3
6'	7,45	s		129,86
4'-OCH3	3,82	s		67,154
2''	7,63	dd		
3''	7,46	dd		
5''	7,46	dd		
6''	7,63	dd		
2''',6'''	7,64	dd		
3''',5'''	7,47	dd		
1''''	3,82			29,34

Les données (UV, IR, RMN ^1H et RMN ^{13}C) reportées ci dessus, sont en accord avec celles de la littérature [81] et mènent à la structure de la figure: 4.28.

II-**I**nvestigation antibacterienne

1. Introduction : Les recherches sur les activités antimicrobiennes, le mode d'action et la composition chimique des plantes connaissent un regain d'intérêt [82-84].

Durant les années écoulées, de nombreux travaux ont été menés par notre laboratoire (LPSO, univ. Bechar), en vue d'inventorier les plantes médicinales à activités antibactériennes et d'extraire leurs principes actifs [85].

De nombreuses plantes de la famille Brassicaceae sont connues par leurs propriétés antifongiques [86], anti-oxydantes et anti-inflammatoires [87,88].

2. Tests antibacteriens des extraits bruts de *M. arvensis* et *Z. macroptera* : La matière végétale (les deux plantes) a été récoltée en mois de mars 2009 dans la région de Oued Bechar (Algérie). Des échantillons des deux plantes sont déposés dans l'herbier du laboratoire de phytochimie et synthèse organique (LPSO, Université de Bechar) sous les codes CA02/32 et CA00/71 pour *M. arvensis* et *Z. macroptera* respectivement.

2.1. Préparation des extraits: La première étape dans la préparation des extraits végétaux est le broyage du matériel végétal. Sous cette forme broyée, la drogue présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions.

10g du produit végétal ont été extraits avec 150 mL de chaque solvant dans un ballon mono col, placé dans le montage à reflux pendant 2 heures. Les extraits organiques ont été concentrés sous vide au Rotavapor sous température spécifiée pour chaque solvant. Après la concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre, ensuite stockés à basse température pour éviter toute dégradation, jusqu'au moment des tests antibacteriens.

Du fait de la non-solubilité des extraits à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution de DMSO. Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des extraits et d'augmenter au maximum le contact germe/composé.

Des solutions sont préparées par l'ajout de 1 mL de DMSO à chaque quantité d'extrait sec.

2.2. Les micro-organismes: Pour l'évaluation du potentiel antibactérien de nos extraits, nous avons préféré de les tester contre plusieurs souches bactériennes, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

Les souches bactériennes utilisées sont: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Klebsiella pneumoniae* (Isolé), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 11778) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) obtenues de l'institut pasteur (Alger, Algérie). Toutes ces souches sont identifiées et purifiées dans le laboratoire de micro biologie de l'université de Bechar (Algérie). Elles ont été maintenues sous-culture sur des plaques de gélose Mueller Hinton (pH 7,4) et conservées à 4 ° C.

2.3. Test antibactérien: L'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des disques; le milieu de culture utilisé est Mueller Hinton [89,90]. Le gel d'agar est traité avec la suspension approprié de micro-organisme où chaque micro-organisme a été inoculé à une concentration de 10^8 unités formatrices de colonies par mL (CFU / mL).

Les boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) ont été remplies avec 10 mL du milieu Muller Hinton, des disques stériles en papier filtre de 6 mm de diamètre chargés de 3 μ L d'extrait étaient déposés sur la surface du support.

Un disque stérile imprégné de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif tandis que le chloramphénicol (10 μ g/mL) a été utilisé comme contrôle positif.

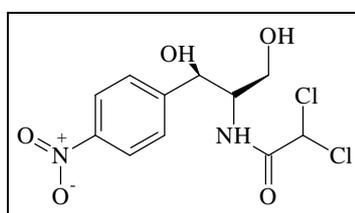


Fig.4.29. Structure de chloramphenicol

Les disques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure des souches à étudier. Placer les disques de telle sorte que leurs centres soient distants d'au moins 24 mm. Une fois les disques déposés sur la gélose, appuyer dessus avec une aiguille ou une pince stérile pour assurer le contact avec la surface du milieu.

Dans les 15 minutes qui suivent l'application des disques, renverser les boîtes de Pétri et les placer dans un incubateur à 37°C pendant 24h à 48h.

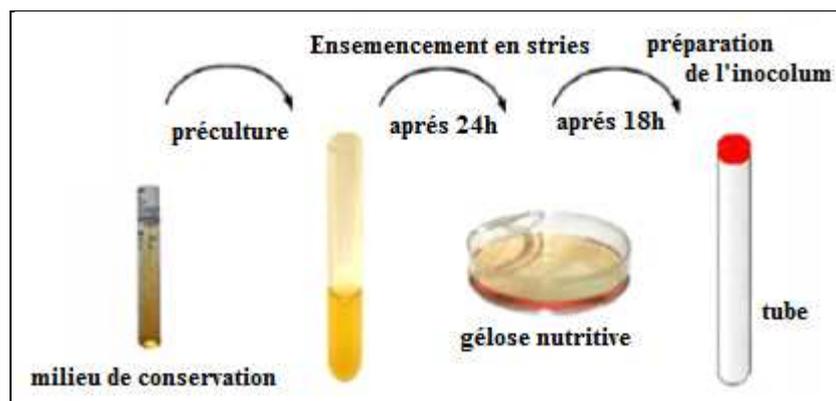


Fig.4.30 : Préparation de l'inoculum.

L'inhibition, quand elle est présente, se manifeste par des zones de stérilité autour des patches imprégnés de principes actifs. Ces zones sont dites : zones d'inhibition. Leur diamètre nous permet d'évaluer le degré d'action des composés traités sur la croissance des bactéries.

Les zones sont mesurées à l'aide des pieds à coulisse ou une règle. Chaque expérience a été réalisée en triple.

2.4. Caractéristiques des souches utilisées : Le choix des souches micro-organiques à soumettre à l'expérience revêt une importance primordiale pour la détection des substances antibactériennes. Les bactéries choisies doivent en effet être très sensibles à la substance expérimentée, à faible concentration ; elles doivent encore représenter un grand nombre de bactéries du même groupe ; elles doivent enfin se prêter facilement à la culture en laboratoire. On utilise en général des bactéries saprophytes. Cependant, pour conférer plus de valeur à l'étude, on peut aussi avoir recours à des bactéries pathogènes et à celles résistant à des antibiotiques courants [89].

Les souches pathogènes utilisées sont celles qui causent les maladies courantes dans la région du sud ouest (infections urinaires, génitales, broncho-pulmonaires, cutanées, intestinales et hospitalières, rhumatisme articulaire, angines....)

Dans notre laboratoire, nous choisissons par exemple, : *Staphylococcus aureus* pour représenter les staphylocoques à Gram(+); *Escherichia coli* pour représenter les bacilles à Gram(-); le champignon *Candida albicans* pour représenter les champignons à enzyme(s).

-Escherichia coli: Est une bactérie aérobie, c'est l'espèce la plus importante d'*Escherichia*. C'est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae qui est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Ce microorganisme peut devenir pathogène et peut provoquer des infections urinaires, biliaires, intestinales et génitales [90,91].

-*Staphylococcus aureus*: C'est une espèce de la famille de Micrococcaceae, constituée de cellules arrondies (cocci à gram positif) disposées en amas ou en grappes de raisin d'où le nom *staphylos* en grec [92]. Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement telles que la chaleur, la sécheresse ou la salinité de l'eau. Ces caractères ubiquitaire et saprophytique expliquent que ces germes soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux.

Les *Staphylococcus aureus* peuvent causer des infections intestinales superficielles, infections des plaies et du sang, comme elles acquièrent facilement des résistances aux antibiotiques, en particulier à la méthicilline et à la pénicilline [89,93]

-*Pseudomonas aeruginosa*: C'est un germe appartenant au groupe des bacilles à Gram négatif (mobiles, aérobies), il pousse facilement sur les milieux usuels, cette espèce se caractérise par la pigmentation bleu-verte de ces colonies [89,93]. Ces microorganismes vivent dans le tube digestif de l'homme, ils sont mobiles et possèdent une ciliature polaire. Ce germe est considéré comme germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [89].

Les *Pseudomonas* vivent à l'état saprophytique dans l'eau, le sol humide et sur les végétaux et sont utilisées dans les applications des recherches biologiques [94,95]

- *Klebsiella pneumoniae* : Ce sont des bacilles à gram négatif capsulés et immobiles, ils se trouvent dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux à sang chaud où peuvent être les agents de maladies septicémiques ou pyohémiques (méningites, abcès du poumon, pyuries). Les *Klebsiella pneumoniae* principalement isolées en milieu hospitalier, peuvent être présentes chez les patients diabétiques, fortement débilisés, ou souffrant de maladies respiratoires chroniques. Ces microorganismes provoquent des infections urinaires suite au passage de la flore fécale aux voies urinaires [96,97].

- *Geobacillus stearothermophilus* : (anciennement *Bacillus stearothermophilus*) : Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet, à Gram variable et catalase variable. Ces microorganismes sont mobiles, ils sont responsables de l'altération des conserves. Ils Assimilent et fermentent le glycérol, glycogène, et mannose, mais pas le lactose ni le galactose. Ils hydrolysent la gélatine et l'amidon. Les formes végétatives peuvent se multiplier à une vitesse très rapide dans les produits tels que les maïs et les pois [97, 98].

- *Enterococcus faecalis*: Est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. *E. faecalis* fermente le glucose sans production de gaz et ne produit pas de réaction catalase en présence de peroxyde d'hydrogène. Sa croissance en bouillon nutritif est compatible avec son caractère anaérobie facultatif.

Comme d'autres espèces du genre *enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans un environnement hospitalier: le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité [98] et au risque nosocomial. *E. faecalis* peut causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie et de la prostate [98,99]. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin [100].

-*Listeria monocytogenes* : Est une bactérie à Gram positif. C'est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'homme ; il s'agit d'un bacille de petite taille, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif (sol, végétaux, eau), possédant une catalase et mobile à 20 °C. Selon certaines études, 1 à 10 % des humains seraient porteurs sains de *L. monocytogenes* dans leur intestin [100].

La transmission par contamination alimentaire resta ignorée de la plupart des médecins jusqu'en 1981 date à laquelle la transmission alimentaire de la listériose fut mise en évidence [100].

La listériose est un germe répandu chez nombre d'espèces animales, soit comme commensal (intestin des bovidés, oiseaux et même de l'homme), soit comme agent de septicémies avec abcès multiples et monocytoses (élevage de souris, lapins) ou encéphalites (moutons, chèvres). Il est de plus très résistant dans les milieux extérieurs et peut se trouver dans la terre, le foin, les débris végétaux, etc [98, 99].

3. Résultats et discussion

A- pour *M.arvensis*: Les résultats du criblage *in vitro* de différents extraits de *M. arvensis* testés contre les bactéries pathogènes sont présentés dans le tableau 4.128.

L'extrait aqueux a eu un effet inhibiteur significatif de toutes les bactéries testées, son activité la plus élevée est contre *E. faecalis* et *P. aeruginosa*. L'activité semble être en raison de la présence de composés polyphénoliques et agents antimicrobiens dans l'extrait aqueux [86,92].

Tab.4.128: valeurs de diamètres des zones d'inhibition(mm)

	Hex	Cyh	Et ₂ O	Dcm	Chl	AcOEt	MeOH	Eau	Ch 10
	Volume/disque (3µL)								µg/mL
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	08	09	08	-	10	10	12	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	13	-	-	07	09	16	30
<i>Escherichia coli</i>	-	10	-	07	07	-	-	12	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09	-	-	12	08	11	12	11	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	11	-	12	12	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08	08	10	12	10	12	15	15	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	08	10	-	-	12	11	13	15

Hex: Hexane, Cyh: Cyclohexane, Et₂O: ether diethyle, Dcm:Dichloromethane, Chl:Chloroforme, EtOAc : acetate d'ethyle, MeOH:Methanol, Ch: Chloramphenicol.

L'extract aqueux et l'extract d'AcOEt ont été les plus efficaces contre le *Staphylococcus aureus*. Selon Ibiri [93], cette bacterie a la réputation d'être en général très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et aux antibiotiques. Il est établi que l'inhibition de cette bactérie par des agents antimicrobiens, nécessite des concentrations considérables. *S. aureus* est la cause d'un certain nombre de maladies affectant l'homme et les animaux [94]. La sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe [94].

Nous avons remarqué que l'extract dichlorométhane est actif contre *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Sachant que l'extract de chloroforme présentait la plus haute inhibition de *L. monocytogenes*. et *P. aeruginosa*. L'extract brut de méthanol a montré une importante activité pour *P. aeruginosa*., *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*, mais il n'avait pas d'activité pour *E. coli*. La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* n'était pas inhibée par les extraits de cyclohexane, l'éther diéthylique et le chloroforme. L'infection causée par *P. aeruginosa* est difficile à traiter avec les antibiotiques classiques [97].

Notre présente évaluation antimicrobienne a montré que, les extraits d'hexane et de cyclohexane n'ont aucune activité contre toutes les bactéries testées.

B- Pour *Z. macroptera*: Les résultats du criblage *in vitro* de différents extraits de *Z. macroptera* testés contre les bactéries pathogènes sont présentés dans le tableau 4.129.

L'extract à l'acétone avait un effet inhibiteur significatif contre toutes les bactéries testées, à l'exception de *E. coli*; son activité la plus élevée est contre *B. stearothermophilus* et *P. aeruginosa*. La croissance de *S. aureus* a été inhibée par tous les extraits sauf AcOEt, ce qui justifie l'utilisation de *Z. macroptera* dans la médecine traditionnelle pour traiter les maladies respiratoires.

Nous avons remarqué que l'extrait Et₂O est actif contre quatre bactéries, son activité la plus élevée est contre *L. monocytogenes*. L'extrait MeOH a la plus haute inhibition de *E. coli* et a montré une activité importante contre *K. pneumoniae*, mais il n'a pas d'activité pour *P. aeruginosa*.

Tab.4.129 : valeurs de diamètres des zones d'inhibition(mm)

	Hex	Et ₂ O	Acetone	EtOAc	EtOH	MeOH	Eau	Chl.10 µg/mL
	Volume/disque (3µL)							
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	10	10	15	14	14	Nt	Nt	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	12	-	10	Nt	Nt	30
<i>Escherichia coli</i>	12	7	-	10	-	15	12	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	10	10	10	10	13	14	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	15	10	10	-	Nt	Nt	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	15	-	20	-	13	28
<i>Staphylocoque aureus</i>	14	12	12	-	12	14	11	15

Et₂O : ether diethyle, EtOAc : acetate d'ethyle, Chl: chloramphenical, Nt : non testé.

Les extraits de MeOH et de l'hexane ont été les plus efficaces contre *S. aureus.*, cette dernière a la réputation d'être en général très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques[101]. Elle est la cause d'un certain nombre de maladies qui affectent les êtres humains et les animaux [89-91].

La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par les extraits d'EtOH et d'acetone, mais elle n'a pas été inhibée par ceux d'AcOEt et d'hexane. L'infection causée par *P. aeruginosa* est difficile à traiter par les antibiotiques classiques [92].

Notre présente évaluation antibactérienne a montré que les extraits d'hexane, d'Et₂O et d'AcOEt n'avaient aucune activité contre *Enterococcus faecalis* et *P. aeruginosa*.

Les extraits aqueux et méthanolique sont les plus actifs contre *K. pneumoniae*. L'activité semble être due à la présence des composés polyphénoliques et des agents antimicrobiens dans ces extraits [93].

Bien que, l'éthanol et le méthanol firent les meilleurs solvants que d'autres en extrayant les composés phénoliques, en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés, les résultats ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement par de l'eau [93, 94] ce qui pourrait expliquer la différence mentionnée précédemment.

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes et les herbivores pathogènes [101].

Les Polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine et lutéoline sont des substances antibactériennes importantes [94,95]. Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes [88]. Ceci pourrait expliquer la modeste activité de nos extraits polaires.

Les composés détectés, après le criblage phytochimique de *Z.macroptera* étaient essentiellement des flavonoïdes, des saponosides et des tanins.

Il a été rapporté que les tanins sont connus pour réagir avec des protéines pour fournir un effet important pour le traitement des tissus enflammés ou ulcérés [96].

Les glucosinolates sont présents dans le Brassicaceae [97,98]. Ces métabolites secondaires ont diverses applications en raison de leurs propriétés antibactériennes. Ces observations confirment donc l'utilisation de *Zilla macroptera* pour traiter certaines maladies.

Les extraits des deux plantes présentent des activités importantes, qui s'étendent sur la totalité des souches testées.

Les souches *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* possèdent un potentiel de résistance plus grand que celui de *Staphylococcus*.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) [101], Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (+) et Gram (-). L'activité des agents antimicrobiens sur les bactéries gram positif peut s'expliquer par l'accessibilité directe de ces molécules aux peptidoglycanes constituant la paroi, provoquant ainsi la dissolution complète de cette dernière. Les bactéries perdent alors leur rigidité et se lysent sous l'effet de leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique.

Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules d'une part, d'une autre part la configuration spatiale des molécules les empêche de traverser les protéines de transport (porines) de la membrane externe des bactéries gram négatif, et ne peuvent pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne[101]. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram(-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger

l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl [94].

Certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) [99].

Il est important, de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres: l'activité intrinsèque des produits actifs et la diversité quantitative et/ou qualitative des composés présents dans ces extraits. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs, ou à certains constituants qui démontrent un synergisme [100].

Il est à signaler que le produit actif qui se présente dans la plante peut être : soit actif sans être métabolisé et aura ainsi une activité *in vitro* et *in vivo* ; soit actif après métabolisation et dans ce cas il sera inactif *in vitro* et actif *in vivo*[100].

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe ou une action moindre, voire même nulle sur un autre.

4. Activités biologiques répertoriées des composés isolés

Comme cela a été décrit dans la partie bibliographique (**chapitre II**), les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités dues en particulier à leur potentiel antioxydant, à leurs éventuelles propriétés estrogéniques, ainsi qu'à leur rôle de phytoalexines chez les plantes [102].

4.1. La génistéine: La génistéine a fait l'objet de nombreuses évaluations biologiques, sur des cibles très diverses. On peut rappeler que la génistéine, en tant que phytoestrogène se lie aux récepteurs aux estrogènes et possède un effet estrogénique ou anti-estrogénique en fonction des tissus. Ainsi, elle aurait un intérêt dans la prévention de certains cancers, dans les maladies cardiovasculaires, dans les troubles liés à la ménopause [103]. Elle exerce une activité inhibitrice sur un certain nombre d'enzymes : MRP1 (multidrug resistance-associated protein, ABCC1) [104], PDE1-2-3 et 5 (inhibition non sélective sur les phosphodiesterases isozymes 1, 2 et 3 [105], l'ADN topoisomérase, la tyrosine protéine kinase et à forte dose l'histidine protéine kinase[103]. Elle possède une activité antiplasmodiale aussi bien sur lignée chloroquino-sensible que sur lignée chloroquino-résistante [106] et est active contre *Mycobacterium tuberculosis* [107].

La génistéine peut inhiber l'oxydation dans des systèmes lipidiques simples (liposomes) mais aussi dans des systèmes plus complexes. Néanmoins, cette inhibition est indépendante du système oxydatif et arrive aussi bien dans des procédés dépendant des métaux que non dépendants [102].

4.2. *L'apigénine* : L'apigénine (ou apigénol) a des propriétés anti-inflammatoires (identique à l'indométhacine). Ce flavonoïde est un potentiel inhibiteur de l'enzyme responsable du métabolisme des médicaments dans le corps [108]. Il entraîne une relaxation artérielle, inhibe la contraction de l'aorte induite par de fortes concentrations de calcium et potassium, ainsi que par l'épinéphrine [109]. C'est un antiviral (herpès, adéno-virus, hépatite B) [110] et anxiolytique, ligand compétitif pour les récepteurs benzodiazépiniques centraux, sédatif sans effet anticonvulsivant ni myorelaxant, hypnotique [108, 110].

L'apigénine brise l'immortalité des cellules cancéreuses et a également pour caractéristique de se lier avec quelques 160 protéines dans l'organisme humain [111]. Ce qui suggère que l'effet protecteur de l'apigénine vis-à-vis du cancer est peut-être le fruit d'un mécanisme chimique plus large, impliquant d'autres aliments que ceux contenant seulement beaucoup d'apigénine [111].

4.3. *La lutéoline*: Ce composé est un anti-inflammatoire [112] comme l'apigénine, il est anti-oxydant, anti-radicaux libres. C'est un puissant inhibiteur de l'angiogénèse anormale des cellules cancéreuses [113].

La lutéoline inhibe la migration des cellules musculaires lisses vers le néo-vaisseau et l'invasion cellulaire en agissant sur la liaison du facteur de croissance (PDGF) à son récepteur [111]. Elle a un effet cardiovasculaire, antispasmodique, inhibition de l'AMP cyclique phosphodiesterase [114].

4.4. *La quercétine*: La quercétine ainsi que la rutine sont reconnues pour être parmi les plus actifs des flavonoïdes. C'est à la quercétine que plusieurs plantes médicinales, doivent une partie de leurs effets thérapeutiques [113,115].

Des études *in vitro* et sur des animaux ont révélé que la quercétine inhibait la production d'histamine et de cytokines, des substances jouant un rôle fondamental dans l'allergie [113].

Une étude épidémiologique menée en Finlande a établi un lien entre la consommation d'aliments riches en quercétine et la réduction du risque d'asthme [115].

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que la quercétine possède des propriétés anti-inflammatoires [116]. Toutefois, les résultats cliniques chez l'humain sont beaucoup moins probants.

Des personnes souffrant d'inflammation chronique de la prostate (prostatite) ou des voies urinaires (cystite interstitielle) ont rapporté un soulagement de leurs symptômes après avoir pris des doses de 500 mg de quercétine, 2 fois par jour, pendant 1 mois [117,118].

Une étude épidémiologique [115] a établi une relation entre une grande consommation d'aliments riches en quercétine et une diminution des troubles coronariens. Les études cliniques, quant à elles, montrent que la prise de suppléments de quercétine entraîne une diminution de la pression artérielle chez les individus hypertendus [119,120]. Enfin, la quercétine inhiberait l'agrégation des plaquettes sanguines, un mécanisme impliqué dans l'athérosclérose [121].

4.5. La taxifoline: ou dihydroquercétine est un bioflavonoïde avec une structure moléculaire proche mais différente de celle de la quercétine.

Des travaux [115,123, 125] ont montré que la taxifoline exerce des effets bénéfiques sur la santé cardio-vasculaire, la peau, la santé du diabétique, l'inflammation, les allergies ou l'immunodéficience. Ainsi, la recherche a, entre autres, souligné que la taxifoline est un très puissant antioxydant avec une activité très supérieure à celle de la vitamine E ou des caroténoïdes ; diminue la viscosité du sang et améliore la microcirculation au niveau des capillaires ; renforce le flux sanguin dans la région de la rétine de l'œil, apportant ainsi une protection contre la perte de vision par dégénérescence maculaire[123,125].

Dans des cas d'encéphalopathies liées à une perturbation de la circulation cérébrale postérieure à un accident cérébro-vasculaire, elle diminue de façon significative l'insomnie [125].

5. Observation de la relation structure-activité antibactérienne

Les relations structure-activité constituent la relation existant entre structure chimique et activité pharmacologique pour une série de composés. Elles ont été abondamment utilisées dans les industries pharmaceutique, chimique et cosmétique, tout particulièrement pour la conception rationnelle de nouveaux principes actifs et de nouvelles entités chimiques [122].

Puisque les différentes activités des flavonoïdes changent considérablement selon les structures et selon la variation et le genre des groupes fonctionnels, quelques rapports ont établi la relation activité-structure (SAR) pour les flavonoïdes [123-125].

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes [126]. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes [126].

De nombreux ptérocarpanes (dérivés d'isoflavonoïdes) sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + [127]. Il semblerait que cette activité soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la

présence de substituants oxygénés en position 3 et 7 apparaît comme essentielle à cette activité [127].

Dans le cas du méthicilline-résistant *S. aureus*, les chaînes aliphatiques latérales dans les flavones (dans la position 6 ou 8), rendent la molécule plus lipophile et augmentent son activité antimicrobienne comparé aux flavones non substitués [128]. Il a été montré avec la bactérie cariogénique (*Actinomyces viscosus* et *A. naeslundii*) que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux B et A essentiellement (5-OH), plus une substitution aliphatique sur le noyau A, détermine l'activité antibactérienne des flavones [129]. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens [126,130], cela est confirmé par le fait que les dérivés glycosylés de la quercétine et de la quercétagine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les microorganismes pathogéniques [131].

La présence des groupes hydroxyles libres dans les positions 3, 3', 4' et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [134], cela est supporté par le résultat de Pupponen *et al.* [133], dans lequel ils ont testé l'activité antibactérienne de la myricétine contre *Lactobacillus* et *E. coli*.

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité [126].

Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des *Staphylococcus aureus* méticilline résistants (SAMR) [134]. Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve des meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' (sur le cycle B) et en 6 (cycle A) [134]. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait être mis en relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes [134]. L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) apparaît comme un agent intéressant pour la prévention des caries dentaires en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec l'incorporation du glucose, diminuant ainsi la synthèse d'acides organiques [134]. De plus une dihydroxylation en méta, soit sur le cycle A soit sur le cycle B, augmente l'activité [135].

Il a été démontré que les 5-hydroxyisoflavanones inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.* [126].

Pour les flavanones, une étude indique qu'une 2',4' ou 2',6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5,7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR. Une

substitution en position 6 ou 8 avec une longue chaîne aliphatique augmente l'activité [126]. Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.*, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2' [126].

Le phénomène de la lipophilie est très important dans les systèmes biologiques, particulièrement au transport passif, car les membranes des cellules sont constituées de deux couches lipidiques, ces dernières facilitent la pénétration et la dissolution des molécules (ou médicaments) lipophiliques (attraction) contrairement aux molécules hydrophiles (répulsion) [136]. Le caractère lipophile d'une molécule traduit souvent des propriétés biologiques comme le métabolisme, la distribution dans les tissus, la liaison avec le site récepteur ...

Des études sur la relation structure-activité entre les substrats et leur absorption percutanée ont permis de déterminer les propriétés physico-chimiques impliquées dans le processus de pénétration dans la peau. Les principaux paramètres sont l'hydrophobicité et la taille moléculaire du substrat et leur possibilité à former des liaisons hydrogènes avec les composés du *Stratum corneum* [137].

En utilisant une méthode de calcul par dynamique moléculaire, il a été rapporté que l'angle de torsion (θ) -(fig.4.31)- entre le cycle B et le reste de la molécule est influencé par la nature du flavonoïde et la présence de substituants. De plus, la dynamique réalisée dans l'eau a montré une variation de cet angle due aux interactions avec les molécules d'eau.

D'une manière générale, les flavonols sont plans en raison de la délocalisation électronique sur l'ensemble de la molécule. Les liaisons hydrogènes entre la fonction carbonyle du cycle C et les hydroxyles en position 5 et 3 et l'interaction entre C₂-H et O₃-H stabilisent la molécule [137].

La substitution de l'hydroxyle en position 3 ou son absence comme dans le cas des flavones conduit à une déformation de la molécule avec un angle θ compris entre 15° et 30°. Les isoflavones ne sont pas planes en raison d'une gêne stérique entre le carbonyle du cycle C et le cycle B.

L'analyse conformationnelle des flavonoïdes glycosylés semble être délicate. En effet, peu de travaux ont étudié par modélisation moléculaire la structure de ces molécules. Ceci peut être dû aux nombreuses liaisons hydrogènes, angles de torsion et aux phénomènes de répulsion stérique.

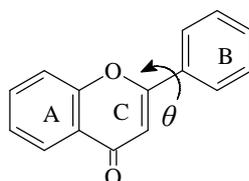


Fig.4.31: Angle de torsion (θ)

Conclusion

Un certain nombre de substances qui se rencontrent couramment chez les végétaux tels que les essences, les tanins, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les glucosides, des fois, sont douées de propriétés antimicrobiennes. Elles exercent une action nocive sur les champignons (*Candida albicans*), d'autres sur les bactéries. Un certain nombre de ces substances antibactériennes sont thermostables et résistent à l'action du milieu alcalin, mais sont détériorées par la pepsine et la trypsine ; certaines autres voient leur activité diminuer dans un milieu contenant de l'albumine. C'est pourquoi, il convient de faire un choix judicieux de la forme pharmaceutique et des voies d'introduction du médicament dans l'organisme, lors de l'élaboration d'une formule de médicament.

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées [61,78,79], il faut citer:

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, l'inhibition du métabolisme microbien, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique.

L'activité antimicrobienne des flavonoïdes est conditionnée par [61,78,79]:

- pour le cycle C: la présence d'une double liaison en 2, 3 avec un groupement oxo en 4 et une hydroxylation en 3;
- pour le cycle A: une dihydroxylation en 5,7 ;
- pour le cycle B: une ortho-dihydroxylation.

Le potentiel antimicrobien des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes. Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule. Les 3 sites de chélation principaux se situent:

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4;
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4;
- Entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

Éléments des références bibliographiques

- [1] Bruneton J. **1999**. "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", 3^{ème} éd., *Tec & Doc.*; Paris, 199-204.
- [2] Ongilagha J., Bala A., Hallet R. and Gruber M. **2003**. "Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae" *J. Biochemical Systematics and Ecology*, 31(11),1309-1332.
- [3] Rafael F., Elina C. et Mercedes R. C. **2005**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". *Phytochemistry*, vol.66 (12):175-185.
- [4] Frécharde A., Fabre N. and Peane C. **2001**. "Novel indole-type glucosinolates from woad (*Isatis tinctoria* L.)" *Tetrahedron letters*, Vol.42(51), 9015-9017.
- [5] Dungey G., Joseph P. and Rothnie N. **1988**. "Glucosinolates in the pollen of rapeseed and indian mustard" *Phytochemistry*, Vol.27 (3), 815-817.
- [6] Shulka Y., kalra N., katyar S. and Siddiqui A. **2004**. "Chemopreventive effect of indole-3-carbinol on induction of preneoplastic altered hepatic foci". *Nutrition and cancer*, vol.50 (2), 214-220.
- [7] Sakushima A., Coskum M. and Maoka T. **1995**. "Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*". *Phytochemistry*, Vol. 40(1), 257-261.
- [8] Baumert A., Milkowski C., Schmidt J., Manfred N. and Dieter S. **2005**. "Formation of complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferasefamily". *Phytochemistry*, Vol. 66(11).1334-1345.
- [9] Lone M.L., Ole O., Anette P. and Hilmer S. **1983**. "Sinapine-*O*- β -D-glucopyranoside in seeds of *Alliaria officinalis*" *Phytochemistry*, Vol.22 (1), 219-222.
- [10] Braham H., Mighri Z., Ben Jannet H., Matthew S. and Abreu P. M. **2005**. "Antioxidant Phenolic Glycosides from *Moricandia arvensis*". *J. Nat. Prod.*, 68, 517-522.
- [11] Yaniv Z., Elber Y., Zur M. and Shafferman D. **1991**. "Differences in fatty acid composition of oils of wild cruciferae seed". *Phytochemistry*, Vol.30, 841-843
- [12] Yaniv Z., Shabelsky E., Shafferman D., Granot I. and Kipnis T. **1998**. "Oil and fatty acid changes in *Sinapis* and *Crambe* seeds during germination and early development". *Phytochemistry*, Vol.9 (1), 1-8.
- [13] Berreghioua A. **2006**. "Etude theorique ders conformations preferentielles des flavonoides naturels". Memoire de magister, université de Bechar.
- [14] Maria A., Del pero M. and Carmona S. **1988**. "Flavonoids of *Parodiodoxa*" *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol.16(4), 419-420.
- [15] Forkmann G. **1979**. "Flavanones and dihydroflavonols as biosynthetic intermediates in *Matthiola incana*" *Phytochemistry*, Vol.18 (12), 1973-1975.
- [16] Marles M.S., Grubier M.Y., Graham J. and Muir D. **2003**. "Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of brassica carinata is controlled at the dihydroflavonol reductase locus" *Phytochemistry*, Vol.62 (12), 663-672.

- [17] Durkeet A. and Harborne J.B. **1973**. "Flavonol glycosides in *Brassica* and *Sinapis*" *Phytochemistry*, Vol.12 (5), 1085-1089.
- [18] Ponce M., Scervino J.M., Ocampo A. and Godeas M. **2004**. "Flavonoids from shoots, roots and roots exudates of *Brassica alba*" *Phytochemistry*, Vol. 65 (23), 3131-3134
- [19] Jens R. and Atle M. **2005**. "Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*". *Phytochemistry*, Vol. 66 (16), 1941-1955.
- [20] Jens K.N., Henrik B. J., Palle F., Keld H. and Carl E.O. **1995**. "Asynchronous rythms in the emision of volatiles from *Hesperis matronalis* flowers". *Phytochemistry*, Vol. 38 (4), 847-851.
- [21] Gagnaut J.C., Bitdet D., Perronet J. and Gaillard M. **1989**. "Stérols et stéroïdes", Partie I, Paris-11-31
- [22] Zhen-Huan L., Shoji N., Toshihiro N., Tai-Bao S. and Jin-Zhe X. **1996**. "Cardenolides from *Erysimum cheiranthoides*" *Phytochemistry*, Vol. 41(4), 1187-1189
- [23] Zhen-Huan L., Shoji Y., Toshihiro N., Tai-Bao S. and Jin-Zhe X. **1998**. "Cardiac glycosides from *Erysimum cheiranthoides*". *Phytochemistry*, Vol.49 (6), 1801-1803.
- [24] Venkatramesh M., Karunanandaa B., Gunter C. A., Boddupalli S. and Kishore G. **2003**. "Expression of a *Streptomyces* 3-hydrxysteroid oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytostanols". *Phytochemistry*, Vol.62 (1), 39-46.
- [25] Moreau R.A., Whitaker B.D. and Hiks K.B. **2002**. "Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses". *Progress in lipid research*, Vol.41 (6), 457-500.
- [26] Matsumoto T., Asano S. and Toshihiro I. **1983**. "24-Methylene-25-methylcholesterol, a sterol from the seeds of *Brassica juncea*" *Phytochemistry*, Vol.22 (11), 2619-2620.
- [27] Young-Soo K., Tae-Wulk K. and Seong K. **2005**. " Brassinosteroids are inherently biosynthesized in the primary roots of maize, *Zea mays* L". *Phytochemistry*, Vol. 66(9), 1000-6.
- [28] Souri N., Aberkane M. et Dibi A. **2005**. "Triterpene et sesquiterpenes dans la *Psuderucaria teritifolia*". Seminaire international sur la valorisation des plantes medicinales dans les zones arides. Ouargla les 1, 2 et 3 Fevrier.
- [29] Griffin W.J. and David lin G. **2000**. "Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids". *Phytochemistry*, Vol. 53(8), 623-637.
- [30] Brock A., Herzfeld T., Paschke R., Koch M. and Dräger B. **2006**. "Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids". *Phytochemistry*, Vol. 67(18), 2050-2057.
- [31] Boussaid M., Ben Fadhel N., Zaouali Y., Ben Salah A. et Abdelkefi A. **1998**. "Plantes pastorales en milieux arides de l' Afrique du Nord" .55-59. Tunisie
- [32] Bruneton J. **1993**. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". 2eme édition; université de Paris- sud, France, 389-617.
- [33] Bouhadjera K. **2005**. "Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat d'état, univ. Tlemcen

- [33a] Burke W., Diamondstone B. I., Velapoldi R. A., and Menis O. **1974**. "Mechanisms of the Liebermann-Burchard and R. Zak Color Reactions for Cholesterol" *Clin. Chem.* Vol. 20, No. 7, 794-801
- [34] Boiteau P., Pasich B. et Ratsimamanga A.R. **1964**. "Les triterpénoides en physiologie végétale et animale". Book. French, Gauthier-Villars (Paris): 1370 pages.
- [35] Mabry T.J., Markham K.R., and Thomas M.B. **1970**. "The Systematic Identification of Flavonoids", 35-230. Springer-Verlag, New York. Heidelberg.Berlin.
- [36] Bruneton J. **1999**. "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales". *Editions TEC & DOC*, 3ème édition, PP 783- 785.
- [37] Silverstein R. M. **1998**. "Identification spectroscopique de composés organiques".p75.paris
- [38] Seladji M. , Belmekki N., Azmani I. , Bouziani I. and Bendimerad N. **2013**. "Phytochemical Screening of two Algerian medicinal plants". *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 3 (2):105-109
- [39] Jurd L. and Horowitz R. **1962**. "Spectral properties of flavonoid compounds, in the chemistry of flavonoid compounds", edited by T.A. Geissman, Pergamon Press, New York, 107-155.
- [40] Voirin B. **1983**. "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings". *Phytochemistry*, 22, (10), 2107-2145
- [41] Slade D., Ferreira D. and Marais J. **2005**. "Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids". *Phytochemistry* . 66: 2177-2215.
- [42] Sylvie M. **2011**. "Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae)". Thèse de doctorat. l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé d'ANGERS
- [43] Harborne J.B. **1973**. "phytochemical methods" a guide to modern techniques of plant analysis, chap.2, Eds . Chapman & Hall, London.
- [44] Hing M., Ruo C, lai K. L., franky C., yu H. and zhen-yu C. **2002**"Difference in flavonoid and isoflavone profile between soy bean and soy leaf". *Biomed pharmacother* 56289-295.
- [45] Manferd H., Herbert M. et Berand Z.**1997**. "Methodes spectroscopiques pour la chimie organique" éd Masson , Paris PP 102 , 104 ,200.
- [46]Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) (in) Walter S. Trahanovsky, *Functional Groups in Organic Compounds*, Englewood Cliff, Prentice-Hall Inc., **1971**, 149 p.
- [47] Markham K.R., **1982**. "Techniques of Flavonoid Identification". Academic Press, London
- [48] Harborne J.B. **1967**. "Comparative Phytochemistry of the flavonoïds" (Goodwig,T.W.ed), Academic press, London.
- [49] Markham K.R. **1989**. "Flavones, flavonols and their glycosides In: Harborne", *Methods in plant biochemistry* .197-235.
- [50]Rosler H. and Mabry T. J. **1971**. "New 6-methoxyflavonols from *Centaurea jacea*". *Phytochemistry*, 10, 450-451.
- [51] Iwona W., Agnieszka Z. **2001**. "¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids". *Magn. Reson. Chem.*; 39: 374-380.

- [52] Yaipakdee P. and Robertson L.W. **2001**. "Enzymatic halogenation of flavanones and flavones". *Phytochemistry*. **57**: 341–347
- [53] Amar N. "Sesquiterpènes lactones et flavonoïdes extraits de deux plantes algériennes de la famille des Astéracées". Thèse de doctorat es Sciences, Univ. Mentouri Constantine.
- [54] Horie T. and Yoshizumi O. **1998**. "¹³C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones". *phytochemistry*. **47**(9):863-874.
- [55] Janackovic P., Tesevic V., Milosavljevic S., Vajs V. and Marin P. D. **2004**. "Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*". *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**(3): 355-357.
- [56] Kupchan S. M., Sigel C. W., Hemingway R. J., Knox J. R. and Udayamurthy M. S. **1969**. "Tumor inhibitors-XXXIII : Cytotoxic flavones from *eupatorium* species". *Tetrahedron*, **25**(8) 1603-1615.
- [57] Rao M. M., Kingston D. G. I. and Spittler T. D. **1970**. "Flavonoids from *flourensia cernua*". *Phytochemistry*, **9**(1): 227-228
- [58] Herz W. and Sudarsanam V. **1970**. "Flavones of *Iva hayesiana*". *Phytochemistry*, **9**(4): 895-896
- [59] Harborne J. B. and Hall E. **1964**, "Plant polyphenols-XII.: The occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses". *Phytochemistry*, **3**(3): 421-428
- [60] Yong-Long L. and Mabry T. J. **1982**. "Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*". *Phytochemistry*, **21**(1): 209-214.
- [61] Wong E. **1963**. "5, 7, 3'-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone". *The Journal of Organic Chemistry*; **28**.2336–2339.
- [62] Almeida J.G.L., Silveira E.R. and Pessoa O.D.L. **2008**. "NMR spectral assignments of a new [CO-C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*". *Magnetic Resonance in Chemistry*; **46**: 103-106.
- [63] Veitch N.C. **2006**. "Isoflavonoids of the Leguminosae". *Natural Product Reports*; **24**: 417-464.
- [64] Seghiri R. ? "Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*". Thèse de doctorat d'état. Univ. Mentouri -Constantine. Algérie
- [65] Fathy.M.S, Afaf. H, Amal E. and Shahira.M.E. **2002**. "An Acylated Kaempferol Glycoside from Flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*". *Molecules*, **7**,245-251.
- [66] Yamovoi V.I. and Kaneko T. **2001** "Molecular structure of a novel polymorphic modification of pinostrobin" *Chemistry of Natural Compounds*. **37**(5): 424-427.
- [67] Kohji I. and Nobuyoshi N.**2003**. "Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*; **23**: 411-417.
- [68] Awad M.H.and El egami A.**2002**. "The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent". *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 343-351
- [69] Felice S., Mario D. and Irene D. **2000**. "Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae)". *J.Agric.Food Chem.***84** (7):2659-2662.

- [70] Sachiko T., Koyoko T., Maki A., Hiroyuki O., Hiroshi H., Eiji I. and Tomihisa O. **2004**. "Isolation of cytochrome P₄₅₀ inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*". *J. Nat. prod.* 67, 1839-1841.
- [71] Hongmei L., Jimmy O., Otto S. and Topul R. **1998**. "Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*". *J. Nat. prod.* 62, 70-75.
- [72] Wang F., Jiang K. and Li Z. **2007**. "Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract". *Chinese Journal of Chromatography* 25: 509-513.
- [73] Owen R.W., Gloriano M., Toja E. **2003**. "Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes". *Food and Chemical Toxicology*, 41(5): 703-717.
- [74] Mukherjee K.S., Gorai D., Sohel S. M., Mistri B., Mukharjee B. and Brahmachari G. **2003**. "A new flavonoid from *Limnophila rugosa*". *Fitoterapia*. 74(1-2), 188-190.
- [75] Agrawal P. K. and Markham K.R. **1989**. "Carbon-13 NMR of flavonoids". Elsevier. Amsterdam.
- [76] Savona G., Piozzi F., Rodriguez B. and Servettaz O. **1982**. "Galangustin, a new flavones from *Galeopsis angustifolia*". *Heterocycles*. 19(9):1581-4.
- [77] Ahmed Z.F., Rimpler H., Rizk A.M., Hammouda F.M. and Ismail S.I. **1970**. "Flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt", *Phytochemistry*, 9(7), 1595-1601.
- [78] Nissler L. and Pedro J. **2004**. "Flavonoid binding to a multi-drug-resistance transporter protein: an STD-NMR study". *Anal Bioanal Chem* . 379: 1045–1049.
- [79] Kevin A. **2001**. "Flavonoid characters contributing to the taxonomic revision of the *Hebe parviflora* complex". *phytochemistry*. 56: 453-461.
- [80] Zhou Y., Hirotani M., Yoshikawa T. and Furuya T. **1997**. "Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*". *Phytochemistry*, 44(1) :83-87
- [81] Tokunaru H., Yoshizumi O., Kinichi Z. and Kazuyo Y. **1998**. "¹³NMR spectral assignment of the A ring of polyoxygenated flavones". *phytochemistry* vol 47(5), 863-465
- [82] Olivier K. et Bernhard F. **2001** "Stimulation des défenses naturelles des plantes", *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences/Sciences de la vie*, 324 : 953-963
- [83] Hsieh P.C. **2000**. "Antimicrobial effect of cinnamon extract", *J Agric Chem Food Sci*, 38: 184-193.
- [84] Newton S.M., Lau C., Gurcha S.S., Besra G.S. and Wright C.W. **2002**. "The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*". - *J. Ethnopharmacol.* 79 (1), 57-67.
- [85] Belboukhari N. **2007** "Etude chimique et évaluation biologique de deux plantes médicinales de la région de Bechar: *Launaea arboescens* et *Limoniastrum feei*". Thèse de doctorat. Univ. Sidi Bellabes.
- [86] Franky R., Terras G. and Torrekens S. **1993**. "A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species". *FEBS letters*, 316 (3) :233-240.
- [87] Yu-Ling H. and Yuan-Shiun C. **2002**. "Studies on the antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Isatis indigotica* root". *Phytomedicine*, 9 (5):419-424.

- [88] Saito N., Tatsuzawa F., Nashiyama A. and Shigihara A. **1996**. "Acylated pelargonidin 3-sambubioside-5-glucosides in *Matthiola incana*". *Phytochemistry*, 41(6):1613-1620.
- [89] Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Monteil H. **2000**. "Bactériologie Clinique", 3.Ed. Ellipses, Paris
- [90] Flandrois J. P. **1988**. "Bactériologie médicale pratique" 320 P.Ed. Monique Chomarat.
- [91] Leclerc H. **1993**. "Les *Escherichia coli* responsables de diarrhée", *Arch. Fr, Pediat.* 50:57-67,
- [92] Leclerc H. **1995**. "Microbiologie générale", Ed. Doin, Paris
- [93] Ibiri P.M. **2005**. "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles". Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, Lausanne (Suisse)
- [94] Plotowski M.C. **1987**. "Evaluation of technetium labelling effect on *Pseudomonas aeruginosa* surface properties", *Ann. Ins. Pasteur/Microbiol.* 183: 415-426.
- [95] Hamad E. **2002**. "Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics", *BURNS*, 28: 340-348.
- [96] Buttiaux R. **1974**. "Manuel de techniques bactériologiques", Flammarion médecine-Sciences Paris.
- [97] Schaechter M., Medoff G. et Eisenstein B.I. **1999**. "Microbiologie et pathologie infectieuse", 2.Ed. de Boeck, Paris.
- [98] Ryan KJ. and Ray CG. **2004**. "Medical Microbiology", 4th ed., McGraw Hill, 294–5
- [99] Guesmi A. et Boudabous A. **2006**. "Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie". *Revue des Régions Arides*. Numéro spécial: 224-230.
- [100] Chaïbi A., Ababouch L.H., Belasri K. and Boucetta S. **1997** "Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* spores by essential oils". *Food Microbiology*. 14:161-174.
- [101] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bourouï N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. **2008**. "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities" *C. R. Biologies*. 331: 372-379.
- [102] Patel R.P., Boersma B.J., Crawford J.H., Hogg N., Kirk M., Kalyanaraman B., Parks D.A., Barnes S. and Darley-Usmar V. **2001** "Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging". *Free Radical Biology & Medicine*; 31: 1570-1581
- [103] Dixon R.A. and Ferreira D. **2002**. "Molecules of Interest: Genistein". *Phytochemistry*; 60(3): 205-211.
- [104] Xania-Pietrzak B., Michalak K., Hendrich A.B., Mosiadz T.D., Motohashi N. and Shirataki Y. **2005**. "Modulation of MRP1 protein transport by plant, and synthetically modified flavonoids". *Life Science*; 77: 1879–1891.
- [105] Ko W., Shib C.M., Lai Y.H., Chen J.H. and Huang H.L. **2004**. "Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships". *Biochemical Pharmacology*; 68: 2087–2094.
- [106] Kraft C., Jenett-Siems K., Siems K., Gupta M.P., Bienzle U. and Eich E. **2000**. "Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*". *Journal of Ethnopharmacology*; 73: 131-135.

- [107] Chen L.W., Cheng M.J., Peng C.F. and Chen I.S. **2010**. "Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*". *Chemistry and Biodiversity*; 7: 1814-1821.
- [108] Viola H., Wasowski C., Levi de Stein M., Wolfman C., Silveira R., Dajas F., Medina JH. and Paladini AC. **1995**. "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects". *Planta Med.*;61(3):213-6.
- [109] Feng-Nien K., Tur-Fu H. and Che-Ming T. **1991**. "Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA- 1115(1) : 69-74*
- [110] Zanolini P., Avallone R. and Baraldi M. **2000**. "Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin". *Fitoterapia.*;71 Suppl 1:S117-23.
- [111] Bédard V. **2008**. "Les propriétés anti-angiogéniques des flavonoïdes". Mémoire de maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal, Canada.
- [112] Saebyeol J., Keith W. and Rodney W. J. **2008**. "Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(21): 7534-7539.
- [113] Ko W.G., Kang T.H., Lee S.J, Kim Y.C. and Lee B.H. **2002**. "Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells". *Phytother Res.* May;16(3):295-8.
- [114] Abdalla S., Abu Zarga M. and Sabri S. **1994**. "Effects of the flavone luteolin, isolated from *Colchicum richii*, on guinea-pig isolated smooth muscle and heart and on blood pressure and blood flow. *Phytotherapy Research*, Volume 8, Issue 5, pages 265–270, August.
- [115] Knekt P. and Kumpulainen J. **2002**. "Flavonoid intake and risk of chronic diseases". *Am J Clin Nutr.* Sep; 76(3):560-8.
- [116] Teixeira S. **2002**. "Biflavonoids: proanthocyanidins and quercetin and their potential roles in treating musculoskeletal conditions" *J Orthop Sports Phys Ther* Jul;32(7):357-63.
- [117] Shoskes D.A. and Zeitlin SI. **1999**. "Quercetin in men with category III chronic prostatitis" *Urology*; 54(6):960-3.
- [118] Katske F. and Shoskes D.A. **2001**. "Treatment of intestinal cystitis with a quercetin supplement". *Tech Urol.*; 7(1):44-6.
- [119] Anonyme. **1998**. " Quercetin". *Altern Med Rev.*; 3(2):140-3.
- [120] Perez-Vizcaino F. and Duarte J. **2006**. "Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin". *Free Radic Res*; 40(10):1054-65.
- [121] Hubbard G.P. and Wolfram S. **2006**. "Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation". *J Nutr.* 96(3):482-8.
- [122] Kitta K., Hagiwara Y. and Shilamoto T. **1992**. "Antioxidative Activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from Green barley leaves", *J. Agric. Food. Chem*, 40, p 1843.
- [123] Arora A. , Nair M.G. and Strasburg G.M. **1998**. "Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system" *Free. Radic. Biol. Med.* 24 ,1355–1363.

- [124] Haenen G., Van Acker S. and Tromp M. "Peroxynitrite scavenging by flavonoids". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**; **236**: 591– 593.
- [125] Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. **1996**. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radic Biol Med* 20,933–956.
- [126] Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. **2005**. "Antimicrobial activity of flavonoids". *International Journal of Antimicrobial Agents*; 26: 343-356.
- [127] Jimenez G.L., Alvarez C.M., Munoz D.M. and Rodriguez.G.I. **2008** "Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties". *Phytochemistry Reviews*; 7: 125-154.
- [128] Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T. and Inuma M. **1996**. "comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *J. Ethnopharmacol*, 50(1), p 27.
- [129] Sato M., Fujiwara S., Tsuchiya H., Fujii T., Inuma M., Tosa H. and Ohkawa Y. **1996**. "Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria", *J. Ethnopharmacol.*, 54(2.3), p 171.
- [130] Mendoza L., Wilkens M. et Urzúa A., **1997**. "Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.*, 58(2), p 85.
- [131] Tereschuk M.L., Riera M.V.Q., Castro G.R. and Abdala L. R., **1997**. "Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*", *J. Ethnopharmacol*, 56(3), p 227.
- [132] Mori A., Nishino C., Enoki N. and Tawata S. **1987**. "Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against". *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, 26(8), p 223.
- [133] Pupponen R., Nohynek L., Meier C., kahkonen M., Heinonen M., Hopia A. and oksman-caldentey K. M. **2001** "Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries", *J. Appl. Microbiol.*, 90(4), p 494.
- [134] Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. **2009** "Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies". *Current Medicinal Chemistry*; 16: 3414-68.
- [135] Halbwirth H. **2010** "The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway". *International Journal of Molecular Sciences*; 11: 595-62.
- [136] Grayer R.J. et Harborne J.B. **1994**. "A survey of antifungal compounds from higher plants". *Phytochemistry*; 37: 19-42.
- [137] Chebil L. **2006**. "Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle" thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine (France).

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Certains spécialistes n'ont pas hésité à écrire que le xx^e s. peut être considéré comme le siècle d'or de la pharmacie. Il a vu la synthèse chimique s'organiser et s'industrialiser, donnant naissance à quantité de médicaments synthétiques. Les théories nouvelles de la biochimie végétale ont suscité de nombreux travaux de phytochimie.

Au cours de notre travail, qui s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation des plantes médicinales du sud ouest Algérien entreprise par l'équipe de recherche du Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique (LPSO) de l'université de Bechar, nous avons commenté les études antérieures concernant la famille des Brassicacées à savoir l'usage populaire des ses espèces, leurs substances isolées en s'appuyant la recherche bibliographique sur les deux espèces (*Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*) faisant l'objet de notre investigation.

En effet notre étude a commencé par une enquête ethnopharmacologique réalisée auprès des herboristes et des tradipraticiens (es). Cette enquête nous a permis d'inventorier plusieurs plantes médicinales et de connaître leurs usages populaires.

Nos travaux de screening phytochimique, concernant nos deux espèces cibles, ont permis de détecter les différentes familles de composés existants dans les deux plantes notamment les flavonoïdes. Intéressés par ces derniers, nous en avons fait l'extraction sélective par différents solvants suivie de la séparation, l'isolement et l'identification.

On a pu identifier structurellement neuf (09) flavonoïdes pour la plante *Moricandia arvensis* et dix (10) flavonoïdes pour *Zilla macroptera*.

Suites aux résultats que nous avons eu dans les tests préliminaires (criblage phytochimique), nous avons effectué une évaluation antibactérienne pour les extraits bruts des deux plantes cibles. Cette évaluation a été faite, selon la disponibilité, sur sept (07) souches bactériennes.

Les résultats nous ont montré que les extraits aqueux et méthanolique de *Moricandia arvensis* révèlent une meilleure activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées; l'extrait ethanologique de *Zilla macroptera* montre une activité très importante contre *pseudomonas aeruginosa*. Ces activités sont très probablement dues à la composition chimique (en métabolites secondaires) de chaque plante.

En termes de limites, il faut signaler que :

- du fait de la faible quantité des produits, l'identification chimique de certaines molécules n'a pu être menée à terme,
- du fait des comportements chimiques voisins de certains composés, la séparation était très difficile ou même impossible.

Le travail réalisé sur les deux Brassicaceae, constitue l'étape préliminaire de l'étude des plantes médicinales du Sahara ; il peut être généralisé à d'autres espèces médicinales de la flore algérienne. En effet, plusieurs plans d'actions, projets et interventions devraient être entrepris:

- Réaliser des études sur la préservation de la biodiversité de la flore,
- Encourager les méthodes traditionnelles et les connaissances des populations rurales,
- Renforcer et améliorer la coopération entre les prestataires de la médecine traditionnelle et les intervenants sanitaires dans les communautés,
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité biologique des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.
- Afin de remédier aux problèmes des résistances (naturelles et acquises) des bactéries, une stratégie spécifique doit être prise, notamment la prescription raisonnée des antibiotiques et la politique de recherche de nouvelles substances naturelles ou synthétisées,
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé.

En attendant, nous venons de prouver une fois de plus que les plantes médicinales ne relèvent pas seulement des pratiques mystiques ou magiques mais qu'elles possèdent bien une activité que nous pouvons vérifier par les méthodes modernes expérimentales.

Il est primordial de se rappeler que la nature reste encore, et sans aucun doute pour longtemps, le plus perfectionné de tous les laboratoires.

ANNEXES



Scholars Research Library

Der Pharma Chemica, 2015, 7(8):197-201
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Flavone and flavone glucuronide from *Zillamacroptera*L.(Brassicaceae) Growing in Algerian Sahara

A. Berreghioua¹, A. Cheriti¹ and N. Belboukhari²

¹Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory, University of Bechar, Bechar, Algeria

²Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory, University of Bechar, Bechar, Algeria

ABSTRACT

The Phytochemical investigation of the water-ethanol extract of the aerial parts of *Zillamacroptera* (Brassicaceae), reported the isolation for the first time two flavonoids derivatives named: 8,4'-Diméthoxy,5,7- Dihydroxyflavone and 7-(6''-methylglucuronyl) apigenin. The structures of these compounds were elucidated on the basis of spectral data.

Key words: *Zillamacroptera*, Brassicaceae, Flavonoids, Medicinal plants, Sahara

INTRODUCTION

Natural products have served as an important source of drugs since ancient times and about half of the useful drugs today have been derived from plants. Recently, the search for drugs derived from plants has accelerated. South Algeria with its rich floral resources and ethnobotanical history is an ideal place to screen plants for biological activity and as a source of new pharmacological compounds [A. Cheriti, 2000; A.Gurib-Fakim, 2006, Cheriti et al, 2012]. Brassicaceae is one of the ten most economically important plant families in the world, it contains a number of nutrients and phytochemicals and have been used to treat a wide range of human diseases [Bellakhdar, 1997; Nostro et al., 2000; Berreghioua et al., 2009]. Among the species belonging to this family, *Zillamacroptera* which is a herbaceous medicinal plant widely distributed in Algerian Sahara [Ozenda, 1991], locally known by the common name "Boukhkala".

Following our phytochemical works [Cheriti et al., 2004, Belboukhari and Cheriti, 2006; Belboukhari et al., 2015, Lahmar et al, 2015] on the secondary metabolites and bioactive substances from medicinal plants growing in Algerian Sahara,

Now we are interested in isolating the natural compounds responsible of the antimicrobial activities [Berreghioua et al., 2014] from the ethyl acetate fraction of the water-ethanol extract of the aerial parts of *Zillamacroptera*.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedure: UV spectra were obtained in MeOH solvent with Unicam UV 300 spectrophotometer and Specord 200 Plus spectrophotometer. IR spectra were obtained with a Thermo Nicolet Avatar 320 FT-IR spectrophotometer. The NMR spectra were taken on a Bruker Avance GP 250 (¹H : 250 or 300 MHz; ¹³C : 75 or 125 MHz) Spectrometer. TLC was carried out on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Column chromatography was performed over silica gel 60 (Merck, particle size 230-400 mesh).

Plant material:The whole plants of *Zillamacroptera* were collected during the period of (February-March 2011) from Bechar and identified by PrA. Maarouf (Naama University). A voucher specimen is deposited in the herbarium of Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory (LPSO) of Bechar University under the number CA00/71. The plants parts were grounded into powder from using the grinder.

Extraction and isolation :170g of aerial parts of *Z. macroptera* are contacted with 1700 mL of a mixture of distilled water and ethanol (50/50 (v/v)) with stirring for 48 hours at room temperature. This extract solution is filtered and evaporated (50%). The operation of the maceration was repeated three times, by renewing the solvent, to increase the mass of the extract. The macerate in green color is fractionated successively by four Solvents : *n*-hexan (5x 50mL) for degreasing , chloroform (3 x 50mL) , ethyl acetate (3 x 50mL) and *n*-butanol (3 x 50mL) [Belboukhari and Cheriti, 2007].

To purify the constituents of AcOEt fraction (2.3 g), liquid chromatography on column was achieved by using a column in glass of type 20 mm/300 mm (29/39) filled with a stationary phase of silica gel (0,20 mm) and the mobile phase chosen for this separation is chloroform/methanol (100/0 , 80/20 , 50/50 , 20/80 , 0/100).

RESULTS AND DISCUSSION

According to our previous works [Berreghioua *et al.*, 2009 ; Belboukhari and Cheriti, 2009 ; Berreghioua and Cheriti, 2011], we summarized the information collected from the ethnomedical survey on the traditional uses of *Zillamacroptera* and the usage rate : gastric disorders and stomach pain (47%), diarrhea (21%), kidneys, liver and pancreas pain (11%), Nausea and colds (7%), Respiratory ailments (6%), Eczema (3%).

We summarized in table 1 the information collected from the phytochemical screening. The experimental results on phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, saponosids and tannins. The presence of tannins is confirmed by positive reaction with ferric chloride (FeCl₃). Flavonoids test results showed positive reaction in the presence of magnesium and HCl. In contrast, the study indicated that insaturated sterols and cardinolids were absent in aerial part extracts of our studied plant. However, we observed less presence of steroids and alkaloids.

The separation has been done previously on a mass of (2.3 g) of AcOEt extract. TLC analysis of the samples separated by liquid chromatography on column revealed the existence of two products to different R_f. We have successfully separated one product in the third column and one in the fourth column. We regrouped the results after several separations and analysis chromatographic (Table 2).

Table 1 : Results of phytochemical screening

Alkaloids	+
Cardinolids	-
Flavonoïds	++
Glycosids flavonoïds	+
Insaturated sterols	-
Saponosids	++
Steroids	+
Tanins	++

Table 2 : Results of liquid column chromatography (C3,C4 third and fourth Column)

Compounds	R _f (Color in TLC)			Column	Fractions
	BAW (4/1/5)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (9/1/0.5)	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1)		
1	0.56 (blue)	0.15 (purple)	0.49 (purple)	C3	46-56
2	0.86 (red)	0.77 (purple)	0.40 (red)	C4	77-80

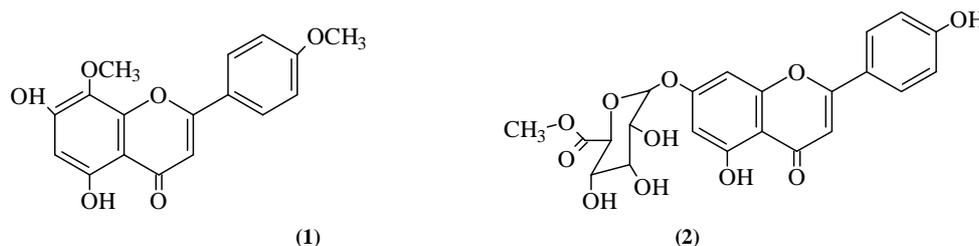


Figure 1: Structures of the molecules isolated from *Zillamacroptera*

8,4'-dimethoxy,5,7-dihydroxyflavone (1)

Molecular formula: C₁₇H₁₄O₆, 64.96(C), 4.45(H), 30.57(O); UV_{max}(MeOH): 320, 270 nm;(MeOH+NaOH):372,210, 326 nm;(MeOH+AlCl₃):360,282,310 nm;(MeOH +AlCl₃ + HCl): 360.5, 282, 308 nm;(MeOH +NaOAc): 346, 279,326 nm;(MeOH +NaOAc+H₃BO₃) 321.5,276 nm. IR(KBr): 3410.02,2967.53, 2934.75, 2858.27, 1629.14, 1508.95, 1416.08, 1459.79, 1257.66, 1028.22, 1055.54, 995.45, 924.43, 667.68cm⁻¹. ¹H RMN(δ (ppm)): 6.86(H-3, s), 12.62(OH-C5, s), 6.28(H-6, s, J=2.1Hz), 7.88(H-2',d, J=8.7Hz), 7.13(H-5',d, J=8.7Hz), 7.88(H-6',d, J=8.7Hz), 3.85(OMe-C8), 3.85(OMe-C-4').¹³CRMN (DMSO-d₆,δ(ppm)): 162.9(C-2),103.1(C-3),181.3(C-4),156.2(C-5),103.7(C-5a),98.1(C-6),157.1(C-7),127.8(C-8),148.8(C-8a),122.9(C-1'), 128.6(C-2'),114(C-3'), 162.3(C-4'), 114 (C-5'), 128.6 (C-6'), 58.3(OMe-C8), 53.4 (OMe-C-4').

7-(6''-methylglucuronyl) apigenin (2)

Molecular formula : C₂₂H₂₀O₁₁, 57.39(C), 4.34(H), 38.26(O);UV_{max}(MeOH) : 3 32, 270 nm;(MeOH+NaOH) : 384, 273nm;(MeOH +AlCl₃) : 375, 271, 310nm;(MeOH +AlCl₃ + HCl) : 375.5, 272, 308nm;(MeOH +NaOAc) : 372, 278nm;(MeOH+NaOAc+H₃BO₃) : 334, 278nm.IR(KBr): 3610.24, 2920.24, 2850 .25, 1699.55, 1640 .99, 1541 .92, 1523.59, 1457, 1098.65, 800.32 cm⁻¹.¹H RMN (δ (ppm)) : 6.72 (H-3, s), 13 (OH-5, s), 6.23(H-6, d, J=2.2Hz), 6.5(H-8, d, J=2.2Hz), 5.36 (H-1', d, J=7.4Hz) , 7.90(H-2', d, J=8.8Hz), 7.05(H-3', d, J=8.8Hz), 7.05(H-5', d, J=8.8Hz), 7.90(H-6', d, J=8.8Hz), 5.30 (H1''glucuronide, d, J=7.3), 3.58 (H-2'', ddd, J=7.2 Hz), 4.87 (OH-2'', d, J=4.0 Hz), 3.59 (H-3'', td, J=8.9 Hz),4.60(OH-3'', d, J=4.0Hz), 3.70(H-4'', ddd, J=4.8 Hz), 4.63 (OH-4'', d, J=4.8 Hz), 4.25(H-5'',d, J=9.4Hz), 3.69(-OCH₃, s). ¹³C RMN (δ(ppm)): 165.6(C-2),104.4(C-3), 183.3(C-4),162.1(C-5), 106.9(C-5a), 100.4(C-6), 163.9(C-7), 95.6(C-8), 158.4(C-8a), 123.2(C-1'), 129.4(C-2'), 116.9(C-3'), 163.1(C-4'), 116.9(C-5'), 129.4(C-6'), 101.1(C-1''), 74.2(C-2''), 77.0(C-3''), 72.6(C-4''), 76.5(C-5''), 52.5(-OCH₃).

According to the results of IR analysis of compounds(1) and (2), the absorption bands observed toward (3410-3610 cm⁻¹) correspond to the vibration of elongation O-H (valence vibration), the aliphatic links C-H is presented in the IR specter by fine and intense bands toward 2934 cm⁻¹. The frequency of vibrations situated toward (2850-2967cm⁻¹) corresponds to the valence vibration of CH₂, the bands of absorption toward (2850 -22858cm⁻¹) associate has vibrations of symmetrical valence of the CH₂[Belboukhari 2007; Belboukhari and Cheriti, 2007; Wagner *et al.*2011]. The frequency of vibration (924- 995cm⁻¹) corresponds to the distortion vibration out of the plan of the unsaturated hydrocarbons. The valence vibration of the cyclic ketones or aliphatic ketones (C = O) to be located toward (1629 -1699 cm⁻¹)[Bitamet_{al.}, 2008]. The vibrations between (1028-1098 cm⁻¹) corresponds to the ether-oxyde group. We note the existence of the bands toward (1098-1258 cm⁻¹) in separated products, which confirms the presence of an aromatic alcohol corresponds to the vibration (aromatic OH), and also the strips toward 1 028 to 1 098 cm⁻¹ made us think about a primary, secondary alcohol or even tertiary[Bitamet *al.*, 2008 ; Calderon, 2011].

The IR spectrum of these products indicates the presence of an unsubstituted aromatic cycle confirmed by the vibrations of elongation (C=C) situated toward 1508 cm⁻¹ and 1629 cm⁻¹, the link (aromatic (=C-H)) is well identified by the distortion vibration toward 667 cm⁻¹.

The band of absorption toward 1257 cm⁻¹ characterizes an ether-oxide aliphatic. In IR, The absorption band situated to 924 – 995cm⁻¹ characterizes a trans ethylic link, and the strip to 1629cm⁻¹ can be probably assigned to the valence vibration of the (C=C) conjugated group. From these primary results, the compounds(1) and (2) can possess the general structure of a flavanone, flavonol and flavone[Calderon, 2011].

The compound(1) was isolated as yellow crystals from the ethyl acetate extract. The chromatographic (TLC) profiles with the presence of two major peaks at 320 nm and 270 nm in UV-visible suggested that this compound belongs to flavonoids class, type flavone (Mabry *et al.*, 1970). The peak at 320 nm showed a bathochromic shift (52 nm) with NaOH indicating that the 4' position is substituted (Voinin, 1983). The same peak has a bathochromic shift (52 nm) with AlCl₃ establishing the presence of an OH in position 5 (Rosler and Mabry, 1971). The Spectrum with (MeOH + AlCl₃ + HCl) for this peak does not present any hypsochromic effect with respect to the spectrum (MeOH + AlCl₃), this fact indicates the absence of orthodihydroxylated system for the two rings A and B. The fact that the second band at 270 nm is moved to (+ 9 nm) with (MeOH + NaOAc) accompanied with the appearance of a new band at 326 nm in favor of a free OH in position 7. The absence of ortho di OH in the position 4' is confirmed by the very small bathochromic shift (+1.5) of the 320 nm band after the addition of H₃BO₃ at (MeOH + NaOAc).

The ¹H NMR spectrum revealed a singlet signal at 12.62 ppm, which confirms the existence of an OH in position 5. A singlet at 6.28 ppm (J = 2.1 Hz; 1H) is attributable to H -6; in the other hand the singlet at 3.85 ppm with 6H integration is corresponding to the two methoxyl groups. The singlet signal at 6.86 ppm is attributable to H -3 and the signal at 7.13 ppm (J = 8.7 Hz; 2H) as a doublet form is assigned to the protons H-3' and H -5'. The same coupling constant that appears to 7.88 ppm with 2H integration, permits us to attribute that signal to H -2 and H -6' position.

The ^{13}C NMR spectrum confirmed the presence of two methoxyl located at 53.4 and 58.3 ppm. We can also distinguish the aromatic(CH) at 98.1, 128.6 and 114 ppm and a carbonyl group at 181.3 ppm. The presence of peak at 103.1 ppm corresponding to carbon -3 which characterize a flavone type structure [Agrawal and Markham, 1989]. According to the chromatographic behavior (fluorescence under UV light (365 nm) and R_f) and the presence of one major peak at 332 nm this compound (2) is either a flavone or flavonol (mono-glycosylated) [Mabry *et al.*, 1970]. The bathochromic effect (52 nm) on this peak after the addition of NaOH indicates the presence of free OH in the position 4', another bathochromic shift (52 nm) was observed with AlCl_3 establishing the presence of a free OH in position 5. A small displacement of the peak is observed when we compare the spectrum ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) with that of AlCl_3 ; this fact suggests the absence of orthodihydroxylated system on the cycle B. The second band exhibits a bathochromic shift (8 nm) with (MeOH + NaOAc) suggesting a free OH in position 7. However, the spectrum (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) done a very small bathochromic shift (2nm) on this peak establishing the absence of the OH group in the di-ortho position C3' and C4' (Rosler and Mabry, 1971; Voirin, 1983).

The investigation of ^1H NMR spectrum shows the presence of two doublets with one integration (1H) at 6.5 and 6.23 ppm ($J = 2.2$ Hz) that characterizes the two protons of H-8 and H-6 respectively. The two doublets at 7.90 ppm and 7.05 ppm with 2H integration at each one ($J = 8.8$ Hz) are due to (H-2', H-6') and (H-3', H-5') respectively, this fact indicates also the oxygenation of B ring in the 4' position of a flavonoid. A singlet at 13 ppm is attributable to OH at C-5 position. A singlet signal at 6.72 ppm with 1H integration is due to H-3, orientating towards a flavone structure. The singlet at 3.69 ppm is due to a methoxy group whereas the doublet at 5.30 ppm ($J = 7.3$ Hz) is attributable to the proton of a sugar (position 7) linked by a CO bond, since all other positions are occupied by protons. Based on the values of the coupling constants, the three doublets with 1H integrating to each one at 4.87 ppm ($J = 4.0$ Hz), 4.63 ppm ($J = 4.8$ Hz) and 4.60 ppm ($J = 4.0$ Hz). The triplet of doublets with 1H integration 3.59 ppm ($J = 8.9$ Hz) and the two doublets of doublets split at 3.58 ppm ($J = 7.2$ Hz) and 3.70 ppm ($J = 4.8$ Hz) are due to the three protons of the three CH groups linked to the three hydroxyls of sugar. The doublet at 4.25 ppm ($J = 9.4$ Hz) with 1H integration must also be part of CH pertaining to sugar [Voirin, 1983; Rosler and Mabry, 1971]. The examination of ^{13}C NMR spectrum shows the presence of CH_2OH group at 59.2 ppm, which directing towards a glucosyl type substituent. All these data permits us to say that this compound (2) is 4', 5'-dihydroxy-7-O-glucosylflavone known as 7-O-glucosylapigenin or 7-(6''-methylglucuronyl)apigenin [Ahmed *et al.*, 1970].

CONCLUSION

In Saharan ethnopharmacopea *Zillamacroptera* plant is used to treat rheumatism, gastric disorders, diarrhea, respiratory ailments and other diseases. From this study, the antimicrobial extract of the aerial parts from this Saharan medicinal plant was selected for phytochemical investigations. The chromatographic analysis of the Ethyl acetate fraction of the water-ethanol extract led to the isolation for the first time two flavonoids derivatives: 4', 7-dimethoxy, 5,7-dihydroxyflavone (1) and 7-(6''-methylglucuronyl)apigenin (2).

REFERENCES

- [1] Agrawal, P. K. and K.R. Markham, 1989. "Carbon-13 NMR of flavonoids". Elsevier. Amsterdam.
- [2] Ahmed, Z.F., H. Rimpler, A.M. Rizk, F.M. Hammouda and S.I. Ismail, 1970. "Flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt", *Phytochemistry*, 9(7), 1595-1601.
- [3] Bellakhdar, J., 1997. "Medecine arabe ancienne et savoir populaire", Ibrispress, 213-224.
- [4] Belboukhari, N. and A. Cheriti, 2006. "Phytochemical Investigation of the Bioactive extract from *Launea arborescens*". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (15): 2930-2932.
- [5] Belboukhari, N., 2007. "chemical study and biological evaluation of two medicinal plants *Launea arborescens* and *Limoniastrum feei*", doctorat thesis, Belabes university, Algeria.
- [6] Belboukhari, N. and A. Cheriti, 2007. "Flavonoids of *Limoniastrum feei*". *Research Journal of Phytochemistry*, 1(2): 74-78.
- [7] Belboukhari, N., Lahmer, N., Sekkoum, K., Cheriti, A., Aboul-Enein, H.Y., 2015, "Chiral Separation of Several Flavanones by Liquid Chromatography", *Current Pharmaceutical Analysis*, 02/2015; DOI: 10.2174/1573412911666150224235740
- [8] Belboukhari, N. and A. Cheriti, 2009. "Analysis and isolation of saponins from *Limoniastrum feei* by LC-UV". *Chem. Nat. Compounds*, 45(5):756-758.
- [9] Berreghioua, A., A. Cheriti, A. Belboukhari & A. Marouf, 2009. "Apercu ethnopharmacologique et chimique des *Brassicaceae*". *Annales Univ. Bechar*. N°5
- [10] Berreghioua, A. and A. Cheriti 2011. "Ethnopharmacologie et screening phytochimique de deux *Brassicaceae* du Sud Ouest Algérien". *Phytochemistry & bioactives Substances conference*. Bechar (Algeria).
- [11] Berreghioua, A., A. Cheriti and N. Belboukhari, 2014. "Antibacterial activity of *Zillamacroptera* extracts from Algerian Sahara" *Phytochem & Biosub Journal*. vol.8 (2), 92-96.

- [12] Bitam, F., M. LetiziaCiavatta, E. Manzo, A. Dibi, M. Gavagnin, **2008**. "Chemical characterisation of the terpenoid constituents of the Algerian plant *Launaea arborescens*". *Phytochemistry*;69(17): 2984-2992.
- [13] Calderon, LA. **2012**. "Chromatography-the most versatile method of chemical analysis". Rijeka:Intech; p. 428.
- [14] Cheriti, A. **2000**, « *Etude ethnopharmacologique sur les plantes médicinales de la région sud ouest Algérien* », rapport CRSTRA, Alger.
- [15] Cheriti, A., N. Belboukhari and S. Hacini, **2004**. "Ethnopharmacological Survey and Phytochemical Screening of Some Medicinal Plants of Algerian Sahara". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 51.
- [16] Cheriti A., Belboukhari M., Belboukhari N. &Djeradi H.; **2012**. " Phytochemical and biological studies of *Launaea* Cass. Genus (Asteracea) from Aklgeriansahara", *Current Topics inPhytochemistry*, Vol11, 67.
- [17] Gurib-Fakim A.; **2006**, *Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine*, Elsevier, UK.
- [18] Lahmer, N., Belboukhari, N., Cheriti, A., Sekkoum, K; **2015**"Hesperidin and hesperitinpreparation and purification from Citrus sinensis peels", *Der PharmaChemica*, 7(2), 1-4.
- [19] Mabry, T.J., K.R. Markham and M.B. Thomas, **1970**. "The Systematic Identification of Flavonoids", 35-230. Spring-Verlag, New York. Heidelberg.Berlin.
- [20] Nostro, A., M.P. Germano, V.D Angelo., A. Marino, M.A. Cannatelli, **2000**. "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity". *LettAppl Mic*; 30: 379-84.
- [21] Ozenda, P., **1991**. "Flore and végétation of the Sahara". Paris :French National Center for scientific Research ;3rd ed., P.270.
- [22] Rosler, H. and T. J. Mabry, **1971**. "New 6-methoxyflavonols from *Centaureajacea*". *Phytochemistry*, 10, 450-451.
- [23] Voirin, B. **1983**. "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings".*Phytochemistry*, 22, (10), 2107-2145.
- [24] Wagner, H., R. Bauer, D. Melchart, A. Staudinger, P. Xiao, **2011**. "Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines thinlayer and high performance liquid chromatography of chinese drugs". New York: Springer; p. 1063.

Preliminary phytochemical investigation of antibacterial extracts from *Moricandia arvensis* growing in Algerian Sahara

Abdelaziz Berreghioua¹, Abdelkrim Cheriti^{1*}, Nasser Belboukhari²

¹Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory University of Bechar, 08000, Bechar, (ALGERIA)

²Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory University of Bechar, 08000, Bechar, (ALGERIA)

E-mail: karimcheriti@yahoo.com

ABSTRACT

An investigation by disc diffusion method of antibacterial activities made it possible to know that the aqueous extract from *Moricandia arvensis* leaves showed a significant inhibition against all bacteria tested. Diethyl ether and Chloroform extracts had only one activity against *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* respectively, whereas the methanolic and water extracts exhibited the highest inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*. The activity seems to be due to the presence of flavonoids, tannins, cardenolids, saponins and alkaloids in the extracts.

© 2013 Trade Science Inc. - INDIA

KEYWORDS

Moricandia arvensis;
Brassicaceae;
Disc diffusion;
Phytochemical.

INTRODUCTION

Microorganisms have the genetic ability to transmit and acquire resistance to antibiotics and have become a major global healthcare problem in the 21st century^[1].

Saharan plants are known by their resistance to several stress factors. Under extreme climatic conditions, Saharan plants could constitute a large reservoir of new natural, safe and effective structural moieties which work together exhibiting a wide range of biological activities^[2-5]. Over 75% of the antibacterial drugs in clinical use are of natural origin^[6].

Like other vegetables, species from Brassicaceae family contain a number of phytochemicals and have been used to treat a wide range of human diseases^[7-9].

In the aim for valorization of medicinal plants growing in Algerian Sahara and exploration of new bioactive natural products^[10,11], it was considered of interest to carry out an antimicrobial investigation of crude extracts from *M. arvensis*. This last, known by the common

name "krom jmal", is widely distributed in Algerian Sahara^[12]. This specie provides food for camels^[13] and it is used for treating various diseases as rheumatism, syphilis and scorbout^[14,15].

Previous investigations on the chemical composition of this specie have led to the isolation of several phenolic glycosides, an indole derivative, glucosinolates, fatty acids and essential oil^[16,17]. No significant antibacterial activity was observed in the study of the effects of essential oils from *M. arvensis* on the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*^[17].

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Moricandia arvensis (syn. *M. suffruticosa*) was collected during full blossom (February-March 2009) from Oued zouzfana (North of Bechar, Algeria) and

identified by Pr A. Maarouf. A voucher specimen is deposited in the herbarium of Phytochemical and Organic Synthesis Laboratory (LPSO) of Bechar University under the number CA02/32

The leaves were dried and grounded into powder before to an extraction using reflux, during two hours, by several solvents with different polarities. The extracts were filtered and evaporated using a vacuum rotary evaporator.

Microorganisms

Pure cultures of the following microorganisms were used: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Klebsiella pneumoniae* (Isolated), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 11778) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) which were obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria). The bacteria were maintained by frequent sub-culturing on Mueller Hinton agar plates (pH 7.4) and stored at 4°C.

Antibacterial test

The antibacterial assay was carried out by discs diffusion method on solid medium; the culture medium used is Muller Hinton^[18,19]. The agar gel is treated with

the appropriate microorganism suspension where each microorganism was inoculated at a concentration of 10⁸ colony forming units per mL (CFU/mL).

Petri box (9 cm in diameter) were filled with 10 ml of the medium Muller Hinton, sterile discs filter paper of 6 mm in diameter charged with 3µl of extract were deposited on the medium surface. Because of the non miscibility of the majority of the investigated extracts, to water and therefore in the medium of culture, a dilution has been achieved by a solution of dimethylsulfoxide (DMSO).

A sterile disc impregnated with DMSO was used as negative control while Chloramphenicol (10µg/ml) was included in the test as reference (positive control). Petri box were incubated at 37°C during 24^h to 48^h^[20]. All plates were observed for zone of growth inhibition. Zones are measured using sliding calipers or a ruler, which is held on the back of the inverted petri plate. Each experiment was carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the *in vitro* screening of different extracts of *M. arvensis* tested against pathogenic bacteria are shown in TABLE 1.

TABLE 1 : Inhibition zone diameter (mm)

	Hex	Cyh	Et ₂ O	Dcm	Chl	EtOAc	MeOH	W	Ch 10 µg/ml
	Volume/disk (3µl)								
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	08	09	08	-	10	10	12	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	13	-	-	07	09	16	30
<i>Escherichia coli</i>	-	10	-	07	07	-	-	12	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09	-	-	12	08	11	12	11	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	11	-	12	12	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08	08	10	12	10	12	15	15	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	08	10	-	-	12	11	13	15

Hex: Hexane, Cyh: Cyclohexane, Et₂O: Diethyl ether, Dcm: Dichloromethane, Chl: Chloroform, EtOAc : Ethyl acetate, MeOH: Methanol, W: Water, Ch: Chloramphenicol

The aqueous extract had a significant inhibitory of all bacteria tested, its highest activity is against *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. The activity seems to be due to the presence of polyphenolic compounds and antimicrobial agents in the aqueous extract^[5,21]. The water and EtOAc extracts were most effective against *Staphylococcus aureus*. According to Ibiri^[22], this last has the reputation to be in general very resistant to all

sorts of antimicrobial agents and antibiotics. It is established that the inhibition of this bacterium by antimicrobial agents, require considerable concentrations. *S. aureus* is the cause of a number of diseases affecting humans and animals^[23]. In spite of advances in medical science, epidemiology and the discovery of new antibiotics, *S. aureus* infections still present considerable morbidity and mortality^[24].

Full Paper

We remarked that the Dichloromethane extract is active against *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. Whereas the Chloroform extract exhibited the highest inhibition of *L. monocytogenes*. and *P. aeruginosa*.

The crude extract of Methanol showed an important activity for *P. aeruginosa*., *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* but it had no activity for *E. coli*.

The growth of *Pseudomonas aeruginosa* was not inhibited by the Cyclohexane, Diethyl ether and Chloroform extracts of *M. arvensis*. Infection caused by *P. aeruginosa* is among difficult to treat with conventional antibiotics^[11].

Our present antimicrobial evaluation showed that, Hexane and Cyclohexane extracts had no activity for all bacteria tested. This result contrasts with the finding that the Hexane leaves extract of *M. arvensis* was to have antibacterial effect on the majority of the bacterial stumps used^[25].

Water, Chloroform and Methanol extracts are the most active against *L. monocytogenes*. In another survey, the last extract showed important free radical scavenging activity toward the DPPH radical, whereas the Chloroform extract exhibited the highest value of TEAC against ABTS⁺ radical^[6].

According to our previous works on phytochemical screening^[26] of *M. arvensis*, the family compounds detected in Methanol, Ethyl acetate, Petroleum ether, aqueous and Chloroform extracts of leaves were essentially flavonoids, tannins, cardinolids, saponins and alkaloids.

As shown in TABLE 2, the presence of flavonoïds, tannins, cardinolids, saponosids and alkaloids in water extracts, is responsible of its hight activity against the majority of bacteria.

Glucosinolates are found in the Brassicaceae and related families^[27]. These secondary metabolites have various applications due to their antibacterial and anti-fungal properties^[28].

In recent study, Skandrani et al.^[29] indicate a significant presence of bioactive compounds in different extracts as: Chloroform extract (tannins 0.61% and sterols 12.5%), Ethyl acetate extract (flavonoids 13.74%, sterols 0.25% and tannins 0.18%), Diethyl ether extract (sterols 15%), Methanol extract (alkaloids 0.18%, flavonoids 8.83%, and tannins 0.10%).

TABLE 2 : Results of phytochemical screening

	Et ₂ O	Chl	EtOAc	MeOH	Water
Flavonoids	-	+	+	+	+
Tanins	-	+	+	+	+
Cardinolids	-	-	-	-	+
Saponosids	-	-	-	-	+
Alkaloids	+	-	-	+	+
Sterols	+	+	+	-	-

Et₂O: Diethyl ether, Chl: Chloroform, EtOAc: Ethyl acetate; MeOH: Methanol, W: Water; (+) Presence; (-) Absence

CONCLUSION

Moricandia arvensis is a dietetic species; it shows an important antioxidant activity and also serves as a source of various bioactive products, including polyphenols.

This present study evaluates antimicrobial effects of extracts from leaves of *Moricandia arvensis*. Extracts showed no effect when using *E. coli*, except for the water. Methanol and water extracts showed more effective antibacterial than the other extracts.

It appears that the majority of extracts from *M. arvensis* can inhibit the growth of some bacteria which causes different infections. This probably explains the use of this plant in traditional medicine against a number of human diseases for generations. Further chemical and pharmacological investigations should be carried out to isolate and identify bioactive compounds in the interesting extracts.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Pr. A. Marouf (Naama University) for identification of plant and N. Boussouar (Bechar University) for his support in the antibacterial test.

REFERENCES

- [1] A.L.Alanis; Arch.Medical Res., **36**, 697–705 (2005).
- [2] N.Belboukhari, A.Cheriti, S.Hacini; Ir.J.Pharm. Res., **3**, 51 (2004).
- [3] N.Belboukhari, A.Cheriti; J.Plant.Sci., **4**, 496-498 (2005).

Full Paper

- [4] N.Belboukhari, A.Cheriti; *Chem.Nat.Comp.*, **45(5)**, 756-758 (2009).
- [5] M.Belboukhari, A.Cheriti, N.Belboukhari; *Nat.Prod.: An Indian J.*, **7(3)**, 147-150 (2011).
- [6] I.Skandrani, M.Ben Sghaier, A.Neffati, J.Boubaker, I.Bouhlel, S.Kilan, A.Mahmoud, K.Ghedira, L.Chekir-Ghedira; *Drug Chem.Toxicol.*, **30(4)**, 361-382 (2007).
- [7] L.W.Wattenburg; *J.Nat.Cancer Inst.*, **48**, 1425-1430 (1972).
- [8] J.Bellakhdar; *La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine Arabe ancienne et savoirs populaires*, Ibis press, Paris, (1997).
- [9] J.V.Higdon, B.Delage, D.E.Williams, R.H.Dashwood; *Pharma.Res.*, **55**, 224-236 (2007).
- [10] N.Belboukhari, A.Cheriti; *Pak.J.Biol.Sci.*, **9(15)**, 2930-2932 (2006).
- [11] N.Belboukhari, A.Cheriti; *Pak.J.Biol.Sci.*, **9(1)**, 1-2 (2006).
- [12] A.Cheriti; [CRSTRA] Report, Medicinal plants of Bechar district, South West of Algeria. Ethnopharmacological studies, Algeria, 17 (2000).
- [13] H.F.Longuo, A.Chehma, A.Ouled Belkhier; *Options Méditerranéennes- Série Séminaire*, **2**, 47-53 (1989).
- [14] E.Le.Floch; *Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne*; Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique: Tunis, 106 (1983).
- [15] M.Cheieb, M.Boukhris; *Gold Time, Tunisia*, 170 (1998).
- [16] A.Belkhiri, G.B.Lockwood; *Phytochemistry* **29**, 1315-1316 (1990).
- [17] A.Zeraib, M.Ramdani, T.Lograda, P.Chalard, G.Figueroa; *Asian J.Plant.Sci.*, **10**, 342-346 (2011).
- [18] A.W.Bauer, W.M.Kirby, J.C.Sherris, M.Turck; *Am. J.Clin.Pathol.*, **45**, 493-496 (1966).
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute, Approved standard: M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th Edition, Wayne, Pa., (2006).
- [20] L.Duraffourd; *Traité de Phytothérapie Chimique*, Edition Masson, (1987).
- [21] A.Cheriti, A.Saad, N.Belboukhari, S.Ghezali; *Flavour Fragr.J.*, **22(4)**, 286-288 (2007).
- [22] P.M.Ibiri; *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse)*, (2005).
- [23] Y.Miyake, T.Iwai, M.Sugai, K.Miura, H.Suginaka; *J.Dent.Res.*, **70**, 1045-1047 (1991).
- [24] I.Couto, J.Melo-Cristino, M.L.Fernandez, T.Garcida, N.Serrano, M.J.Salgado, A.Torres-Pereira, I.S.Sanchez, H.De Lencastre; *J.Clin. Microbiol.*, **33**, 2032-2035 (1995).
- [25] D.Dals, I.Limem, H.Ben Mansour, J.Chibani, L.Chekir ghedira, K.Ghedira; *Rev.régions arid.*, **1**, 262-269 (2007).
- [26] (a) A.Berreghioua, A.Cheriti; *PhytoChem & BioSub Conf.* Bechar (Algeria), December (2011). (b) A.Berreghioua, A.Cheriti, N.Belboukhari, A.Marouf; *Ann.Univ.Bec.*, **5**, 15-25 (2009).
- [27] S.F.Vaughn, M.A.Berhow; *Ind.Crops Prod.*, **21**, 193-202 (2005).
- [28] A.A.Al-Gendy, O.D.El-Gindi, A.S.Hafez, A.M.Ateya; *Food Chem.*, **118**, 519-524 (2010).
- [29] I.Skandrani, I.Bouhlel, I.Limem, J.Boubaker, W.Bhourri, A.Neffati, M.Ben Sghaier, S.Kilani, K.Ghedira, L.Ghedira-Chekir; *Toxicol.In Vitro*, **23(1)**, 166-175 (2009).

Antibacterial activity of *Zilla macroptera* extracts from Algerian Sahara

Abdelaziz BERREGHIOUA¹, Abdelkrim CHERITI¹ & Nasser BELBOUKHARI²

¹Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory

²Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory
University of Bechar. 08000, Bechar, Algeria

Received: November 17, 2013; Accepted: January 25, 2014

Corresponding author Email azizberghioua@yahoo.fr

Copyright © 2014-POSL

DOI:10.163.pcbjsj/2014.8.2.92

Abstract. The study reported the antibacterial activity of extracts from aerial parts (without fruits) of *Zilla macroptera* (Brassicaceae) against seven bacterial strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus stearothermophilus* and *Staphylococcus aureus*) chosen for their high pathogenicity, shows that the strain of *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to the majority of extracts. The antibacterial activity of the ethanol extract is more important compared to other extracts.

Key Words: *Zilla macroptera*, Brassicaceae, antimicrobial activity, ethnopharmacology, phytochemical screening, Sahara

Introduction

Natural products possess interesting biological activities which attracted several researchers to their elucidation to provide knowledge that will lead to advancement medicine. Brassicaceae is one of the 10 most economically important plant families in the world, it contain a number of nutrients and phytochemicals and have been used to treat a wide range of human diseases [1-3].

Recently, researchers have reported the antimicrobial activity of traditional medicinal plants worldwide. So, it is of great interest to screen a wider range of cruciferous species from Sahara for production of antimicrobial metabolites.

The present investigations have focused on the *in vitro* screening of various extracts of *Zilla macroptera* tested against bacteria.

Materials and Methods

Vegetal product

Zilla macroptera, known by the common name “Boukhlala”, is widely distributed in Algerian Sahara [4]. It was collected during the period of (February-March 2009) from Bechar (South Algeria). A voucher specimen is deposited in the herbarium of Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory (LPSO) under the number CA00/71 [5].

Zilla macroptera is a Saharan medicinal plant used by local population for various diseases. According to our previous works [2, 6, 7], we summarized in table 1 and 2 the information collected from the ethnomedical survey on the traditional uses of *Zilla macroptera* and the phytochemical screening.

Table 1: Usage rate and diseases treated by *Zilla macroptera*

Diseases	(%)
gastric disorders and stomach pain	47
diarrhea	21
kidneys, liver and pancreas pain	11
Nausea and colds	7
Respiratory ailments	6
Eczema	3

Table 2 : Results of phytochemical screening

Alkaloids	Saponosids	Tanins	Insaturated sterols	Steroids	Cardinoldis	Flavonoïds	Free Flavonoïds	Glycosids flavonoïds.
+	++	++	-	+	-	++	+	+

Microorganisms

Pure cultures of the following microorganisms were used : (*Bacillus stearothermophilus* (*B.s*) (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (*E.f*) (ATCC 29212), *Escherichia coli* (*E.c*) (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*), *Listeria monocytogenes* (*L.m*) (ATCC 19115), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*) (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (*S.a*) (ATCC 25923) which were obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria). The bacteria were maintained by frequent sub-culturing on Mueller Hinton agar plates (pH 7.4) and stored at 4°C.

Antibacterial test

Aerial part of *Zilla macroptera* was dried at room temperature for two weeks and it was cut into small pieces before to an extraction using reflux, during four hours (4h), by several solvents with different polarities. The extracts were filtered and evaporated using a vacuum rotary evaporator.

The antimicrobial activities were carried out by the disc diffusion method of Müller-Hinton on solid medium; the strains were reactivated using an 20^h culture growth at 37°C and adjusted to 10⁸ CFU/mL.

Petri boxes (9 cm in diameter) were filled with 10 ml of the medium Muller Hinton. The bacterial strains was sowed on the surface of the agar plates in radial spots form by means of

swab and suspensions of young bacterial cultures prepared according to the committee for laboratory standards institute (CLSI) [8]; because of the non miscibility, of the majority of the investigated extracts, to water and therefore in the medium of culture, a dilution has been achieved by a solution of dimethylsulfoxide (DMSO). The application is made by sterile filters paper discs (6 diameter) which were placed on the inoculated agar surfaces and impregnated with 3 μ L of each extract; One disc impregnated with DMSO was used as negative control while chloramphenicol (10 μ g/ml) was included in the test as reference (positive control). A gentle downward pressure should be applied to each disc before incubation to ensure complete contact between the disc and the agar surface. Petri box were incubated at 37°C during 24h to 48h [9,10] and the reading of the results was made by the measurement of the inhibition diameter around the disc, using sliding calipers or a ruler, which is held on the back of the inverted petri plate. Each experiment was carried out in triplicate.

Results and discussion

The experimental results on of phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, saponosids and tannins. The presence of tannins is confirmed by positive reaction with ferric chloride (FeCl₃). Flavonoids test results showed positive reaction in the presence of magnesium and HCl. In contrast, the study indicated that insaturated sterols and cardinolids were absent in aerial part extracts of our studied plant. However we observed less presence of steroids and alkaloids.

The antibacterial activity is summarized in table 3. The acetone extract of leaves had a significant inhibitory of all bacteria tested, except *E.coli*; its highest activity is against *B.s* and *P. aereginosa*.. The growth of *S.a* was inhibited by all extracts except EtAcO, which justifies the use of this plant in traditional medicine for treating respiratory diseases.

Table 3: Inhibition zone diameter (mm)

	Hexane	DEt	Acetone	EtOAc	Ethanol	Methanol	Water	Chl. 10 μ g/ml
	Volume/disk (3 μ l)							
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	12	-	10	Nt	Nt	30
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	15	10	10	6	Nt	Nt	15
<i>Staphylocoque aureus</i>	14	12	12	-	12	14	11	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	10	10	10	10	13	14	15
<i>Bacillus steariothermophilus</i>	10	10	15	14	14	Nt	Nt	25
<i>Escherichia coli</i>	12	7	6	10	6	15	12	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	15	-	20	-	13	28

DEt: diethyl ether, EtOAc : ethyl acetate, Chl: chloramphenicol,
 Nt : not tested.

The MeOH and hexane extracts were most effective against *S. aureus*. [11], this last has the reputation to be in general very resistant to all sorts of antimicrobial agents and antibiotics. It is the cause of a number of diseases affecting humans and animals [12-14].

We remarked that Et extract is active against four bacteria, its highest activity is against *L. monocytogenes*. Whereas the MeOH extract exhibited the highest inhibition of *E. coli* and showed an important activity for *K. pneumoniae*, but it had no activity for *P. aeruginosa*

The growth of *pseudomonas aeruginosa* was inhibited by EtOH, but it was not inhibited by EtOAc, Et and hexane extracts of aerial part of *Z. macroptera*. Infection caused by *P. aeruginosa* is among difficult to treat with conventional antibiotics [15].

Our present antimicrobial evaluation showed that hexane, DEt and EtOAc extracts had no activity for E f and P a bacteria tested.

Water and methanol extracts are the most active against *K. pneumoniae*. The activity seems to be due to the presence of polyphenolic compounds and antimicrobial agents in the aqueous and methanol extracts [16]. The water, methanol and ethyl acetate solvents being currently used for the extraction of polyphenols and flavonoids; these last are considered as potent antioxidants, anti-inflammatory, antiviral and anti-bacterial [17, 18].

The family compounds detected, after the phytochemical screening [7] of *Z. macroptera* were essentially flavonoids, saponosids and tannins.

It was reported that tannins are known to react with proteins to provide the typical tanning effect which is important for the treatment of inflamed or ulcerated tissues^[25]. Herbs that have tannins as their main components are astringent in nature and are used for treating intestinal disorders such as diarrhea. Glucosinolates are found in the Brassicaceae and related families. These secondary metabolites have various applications due to their antibacterial properties [19-22]. These observations therefore support the use of *Zilla macroptera* in herbal cure remedies.

Conclusion

According to the test results of antibacterial activity, it appears that some extracts of this plant were found to be active with a different degree, related to the content of the extracts and interactions of substances with antibacterial activity of extraction solvents.

Traditionally, *Zilla macroptera* plant is used to treat rheumatism, gastric disorders, diarrhea, Respiratory ailments and other diseases; the inhibition of the growth of bacteria responsible for these diseases can at least partially justify the ethno pharmacological uses of this plant.

The plant studied here can be seen as a potential source of useful drugs. Further studies are going in order to isolate, identify, characterize and elucidate structures of the bioactive compounds.

References

- [1] Nostro A, Germano MP, Angelo VD, Marino A, Cannatelli MA. **2000**. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Mic*; 30: 379-84
- [2] Berghioua A., Cheriti A. Belboukhari A. & Marouf A. Apercu ethnopharmacologique et chimique des *Brassicaceae*. **2009**. Annales de l'Université de Bechar. N°5
- [3] Bellakhdar, J. "Medecine arabe ancienne et savoir populaire", **1997**, Ibris press, 213-224.
- [4] Paul Ozenda. **1991**. flore et végétation de Sahara. 3^{ème} édition CNRS Editions. Paris
- [5] Belboukhari, N. Etude chimique et evaluation biologique de deux plantes medicinales de la region de Bechar, *Launea arborescens* et *Limoniastrum feei*, These de doctorat, **2007**.
- [6] Belboukhari N. and Cheriti A., **2009** *Chem. Nat. Compounds*, 45(5), 756.

- [7] Berreghioua A. & Cheriti A. **2011**. Ethnopharmacologie et screening phytochimique de deux Brassicaceae du Sud Ouest Algérien. Phytochemistry & bioactives Substances conference. 4 and 5 December, Bechar (Algeria)
- [8] J.A. Kiehlbauch, G.E. Hannet, M. Salfinger, W. Archinal, C. Monserrat, C. Carlyn, **2000**. Use of the national committee for clinical laboratory standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories, *J. Clin. Microbi.* 38, 3341-3348.
- [9] L. Duraffourd, **1987**. *Traité de Phytothérapie Chimique (Chemical Treaty of Phytotherapy)*, Edition Masson.
- [10] Oumessaad Toubal, Abdelghani Djahoudi and Amel Bouzabata. **2011**. Preliminary Studies and Antimicrobial Evaluation of the Aerial Parts of *Genista numidica* ssp. *Numidica*. *Journal of Life Sciences*; Nov, Vol. 5 Issue 11, p954.
- [11] Ibbiri PM.C. **2005**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse).
- [12] Miyake, Y. ; Iwai, T. ; Sugai, M. ; Miura, K. and Suginaka, H. **1991**. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. *J. Dent. Res.* 70, 1045-1047.
- [13] Adegoke, G. O. and Ojo, M. O. **1982**. Biochemical characterization of staphylococci isolated from goats. *J. Clin. Microbiol.* 7, 463-470.
- [14] Couto, I. ; Melo-Cristino, J. ; Fernandez, M. L. ; Garcida, T. ; Serrano, N. ; Salgado, M. J. ; Torres-Pereira, A. ; Santos Sanchez, I. and De Lencastre, H. **1995**. Unusually large number of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Portuguese Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2032- 2035.
- [15] Cheriti A and. Belboukhari N. **2006**. Antibacterial and antifungal activities of crude extracts from *Launaea arborescens*, *Pak.J.Biol.Sci.* 9(1):1-2
- [16] Belboukhari N., Cheriti A. and Hacini S. **2004**. ethnopharmacological survey and phytochemical screening of some medicinal plants of Algerian Sahara. *J.pharm.res.*, 3:51
- [17] Bruneton J. Pharmacognosie –phytochimie-plantes medicinales. **1999**. 3^{ème} édition . TEC.DOC.
- [18] Oliver Chen, Blumberg JB. **2008**. Are the age –related changes in flavonoid bioavailability ? *Phytochemicals aging and health*, New york : Taylor francis group.
- [19] Parekh, J., Chanda, S. **2007**. *Braz. J. Microbiol.* 38, 2.
- [20] Dharmananda, S. **2003**. Gallnuts and the uses of Tannins in Chinese Medicine. In: *Proceedings of Institute for Traditional Medicine*, Portland, Oregon.
- [21] a) Fahey, J.W. ; Zalcmann A.T. and Talalay, P. **2001**. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56: 5-51.
b) Raybould, A.F. and Moyes, C.L. **2001**. The ecological genetics of aliphatic glucosinolates *Heredity*, 87: 383-391.
- [22] a) Rodriguez, S.A.; Vela Gurovic, M.S. ; Mulet M.C. ; and. Murray, A.P. **2006**. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., a source of a potentially antifungal essential oil containing nitrile. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34: 353-355.
b) Al-Gendy, A.A., O.D. El-Gindi, A.S. Hafez and A.M. Ateya, **2010**. Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss (Brassicaceae). *Food Chem.*, 118: 519-524.