

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique**

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie



Mémoire

Présenté pour l'Obtention du diplôme de Master

Académique

Spécialité : Chimie

Option : *Phytochimie*

Par : Safa BENHAMED & Fatma TABAI

Thème :

**Séparation et détermination structurale et métabolite
secondaire d'une plante algérienne-activité biologique
,activité anticorrosion.**

Soutenu le 10 / 06 / 2018 devant la commission d'examen :

Atia Salem	M.C.A	Président
Hamada Djamila	M.A.B	Examinatrice
Mekhelfi Tarak	Professeur	Rapporteur

Année universitaire : 2017 / 2018



D

édicace :

A ceux qui m'ont entretenus sur leur amour et l'amour de la science , Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Ma mère et mon père sont ma vie Je suis fier de vous , Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses. À tous ceux qui m'ont enlevé un nuage d'ignorance À tous mes professeurs sans exception Aux travailleurs de cette institution individuellement Aux sœurs qui sont nées avec les jours mes amis À chaque branche . qui Appartient l'arbre de ma famille Je partage avec vous ma joie comme vous avez partagé mes années de persévérance .



Safa & Fatima .

A decorative border in shades of purple and pink surrounds the text. It features a butterfly in the top left, a large rose in the bottom right, and various smaller flowers and leaves. The background is a light, textured purple.

*R*emerciement :

Thanksgiving n'est pas la récompense que nous devons doit parfois offrir aux autres, mais c'est un reconnaissance au moins .

La première grâce à l'éminent professeur Tarek Mekhelefi pour son suivi et pour toutes les opportunités qu'il nous a données à ce stade, et au Comité Discussion: Le Professeur , HAMADA Djamila et le Professeur Atia Salem Saad pour s'acceptent de discuter de notre humble mémoire.

Ce succès était le résultat de l'appui de nombreux , nous remercions tous ceux qui sont dans le laboratoire VPRS soit les professeurs ou étudiants; remercient également les soldats de laboratoire de la chimie analytique , un grand merci spécialement pour l'étudiante le doctorant Jamila et le chef du département de chimie sur toutes les facilités fournies par vous.

Sommaire :

Le titre	La page
Introduction générale	1

La partie théorique

Chapitre I : L'étude théorique de la plante

I-1-introduction	
I-1-1-Description botanique	3
I-2-Classification systématique de la plante <i>S.Africana</i>	
I-3-Etude chimique antérieure sur la plante <i>S.Africana</i>	
I-3-1-Les flavonoïdes et les acides phénoliques	
I-3-1-1- les flavonoïdes	4
I-3-1-2-Les acides phénoliques	
I-3-2-Les terpènes	5
I-3-3-Les huiles essentielles	
I-3-4-Propriétés pharmacologiques du <i>S.Africana</i>	
I-3-4-1-Utilisation en médecine traditionnelle	
I-3-4-2-Quelques activités biologiques reconnues	6

Chapitre II : Les métabolites secondaires

II-1-Introduction	
II-2-Les terpènes	8
II-3-Les composés phénoliques et les flavonoïdes	9
II-3-1-Les composés phénoliques	
II-3-2-Les flavonoïdes	
II-3-2-1-Généralité et définition	10
II-3-2-2-Classification des flavonoïdes	11
II-3-2-3-Source des flavonoïdes	
II-3-2-4-La chimie des flavonoïdes	
II-3-2-4-1-La biosynthèse des flavonoïdes	12
II-3-2-4-2-Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes	
II-3-2-4-3-L'extraction	13
II-3-2-4-4-Détection des flavonoïdes	
II-3-4-4-1-Test préliminaires des Flavonoïdes	14

II-3-4-4-2- Première détection	15
II-3-2-4-5-Séparation et purification	16
II-3-2-4-6-Carectérisation structural	
II-3-2-4-6-1-Facteur de retardement chromatographique	17
II-3-2- 4-6-2-Fluorescence sus lumière de Wood	
II-3-2- 4-6-3-La spectrophotométrie UV-Visible	18
II-3-2-4-6-4-Cromatgraphie et la séparation sur la CCM préparatoire	
II-3-2- 4-6-4-1-Spectre méthanolique	19
II-3-2-4-6-4-2-Addition des réactifs	20
II-3-2-4-6-5-RMN monodimensionnelle	
II-3-2-4-6-5-1-RMN H ¹	21
II-3-2-4-6-5-1-a-Les déplacements chimiques pour différents protons A et B	
II-3-2-4-6-5-1-b- Les déplacements chimiques des protons du noyau C	22
II-3-2-4-6-5-1-c- Les déplacements chimiques du protons méthoxyles	
II-3-2-4-6-5-1-d- Les déplacements chimiques des protons de sucre	
II-3-2-4-6-5-2-RMN C ¹³	
II-3-2-4-6-6-RMN bidimensionnelle	23
II-3-2- 4-6-7-Spectrométrie de masse	
II-3-2- 4-6-7-A-Pour les flavonoïdes aglycones	
II-3-2- 4-6-7-B- Pour les flavonoïdes glycolyses	24
II-3-2-4-7-Couplage des technique chromatographique avec des techniques Spectroscopiques	
II-3-2-4-8-Paremètres affectant la stabilité des flavonoïdes	
II-3-2-4-9-Le rôle des physiologiques des flavonoïdes	25
II-3-2-4-10-Les flavonoïdes comme antioxydants	26
II-3-2-4-11-Distriibition et localisation des flavonoïdes	
II-4-Les alcaloïdes	27

Chapitre III : Rappelles sur les activités étudier

III-1-Activité antioxydant	
III-1-1-Stress oxydatif	
III-1-2-Déinition de radicale libre	
III-1-3-Espèces réactives de l'oxygène	29
III-1-4-Les radicales libres oxygénés	
III-1-5-Conséquence du stress oxydatif	
III-1-6-Définition de l'antioxydant	30
III-2-Activité antibactérienne	
III-2-1-Méthode de diffusion	
III-2-2--Méthode de micro-dilution	31
III-3-Activité anticorrosion	
III-3-1-Corrosion des métaux	
III-3-2-Inhibiteurs de corrosion dans les milieux acides	
III-3-3-Classes des inhibiteurs	
III-3-3-1-Inibiteurs organiques	
III-3-3-2-Inhibiteurs inorganiques	32
III-3-4-Produits naturelles comme inhibiteurs de corrosion des métaux en milieux corrosif	33

L'étude expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV-1-L'étude phytochimique de la plante	
IV-1-1-Récolte de matériel végétale	
IV-1-2-L'extraction	35
IV-1-3-Les tests préliminaires phytochimiques	36
IV-1-4-Séparation et purification	
IV-1-4-1-Preparation de plaque CCM	
IV-1-4-2-La cellule chromatographique	
IV-1-4-3-Les enchantions	37
IV-1-5-Les analyses préliminaires	38
IV-1-6-Le processus de séparation réel	39
IV-2-Dosage des polyphénols totaux	40
IV-3-Dosage des flavonoïdes	41
IV-4-Etude de l'efficacité antioxydant des extraits	
IV-4-1-Piégeage du radical libre DPPH	42
IV-4-2-Activité antioxydant totale	43
IV-5-Activité antibactérienne	
IV-5-1-Choix des souches	44
IV-5-2-Préparation des extraits	
IV-5-3-Sterilisation	
IV-5-4-Les étapes de travail	45

IV-6-L'étude de l'activité anticorrosion	
IV-6-1-Preparation des échantillons	
IV-6-2-Appariels et outils usagé	
IV-6-3-Preparation des solutions	
IV-6-4-Mode opératoire	46

Chapitre V : Les résultats & discussions

V-1-Les études phytocimique	
V-1-1- Les tests préliminaires	
V-1-2- Résultats de la séparation et purification	48
V-1-3-Les résultats de l'estimation quantitative	
V-1-3-1-Dsage des polyphénols totaux	49
V-1-3-2-Dosage des flavonoïdes	50
V-1-4-Resultats de l'étude de l'activité antioxydants	
V-1-4-1-Piegeage du radical libre DPPH	51
V-1-4-2-Activité antioxydant totale	53
V-1-5-Resultats de l'activité antibactérienne	55
V-2-Resultats de l'activité anticorrosion	56

CONCLUSION GENERALES

Les références

Liste des figures :

La figure	La page
I- Les arrangements naturelles les plus fréquentes de l'unité isoprène	8
II- structure de base des flavonoïdes	10
III- structure des squelettes des principaux groupes flavonoïdes et des classes des flavonoïdes	11
IV- Schéma de la voie de biosynthèse simplifiée des flavonoïdes	12
V- Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique	18
VI- Représentation des éléments structuraux des flavonoïdes importants pour la neutralisation des radicaux	26
VII- Photos de <i>Santolina Africana</i> en période de floraison, et la zone géographique à partir de laquelle a été récoltée	34
VIII- Protocole d'extraction des polyphénols et flavonoïdes	35
IX- Les quatre plaques CCM qui contiennent les phases organiques après les exposées à la vapeur d'ammoniac	39
X- Photos de la résultat de la séparation de phase chloroformée	39
XI- La courbe standard de l'acide gallique	41
XII- La courbe standard de la quercétine	41
XIII- Méthode de piégeage de radical libre DPPH	42
XIV- La courbe standard de l'acide gallique	43
XV- La courbe standard de phosphomolybdène	44
XVI- Quelques photos du l'étapes de travail	44
XVII- Le résultat de séparation des trois échantillons	49
XVIII- Le pourcentage de quantification des polyphénols	50
XIX- Le pourcentage de quantification des flavonoïdes	51
XX- Les courbes de pourcentages d'inhibition des extraits de <i>S.Africana</i>	52
XXI- Les courbes de la capacité totale antioxydant des extraits	54
XXII- Image des résultats de l'activité antibactérienne	55
XXIII- Représentant les courbes de Tafel pour les différents concentrations de l'extrait brut	56

Liste des tableaux :

Le tableau	La page
I -Classification systématique de plante <i>Santolina .africana</i>	4
II - Les structures des terpènes	5
III - Les classes les plus importants des composés phénoliques des plantes	9
IV - Les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH_3	14
V -La relation entre le R_f et les structures flavoniques	16
VI - La relation entre la fluorescence et les structures flavoniques sous la lumière de Wood	17
VII - Relation entre le Maximin d'absorption en UV et le type de flavonoïdes	19
VIII - Les principaux déplacement des bandes I & II	20
IX - Les déplacements chimiques les plus importants pour différents protons A & B pour les deux anneaux	21
X - Les techniques RMN bidimensionnelle	23
XI - Quelques alcaloïdes et leurs indication thérapeutique	27
XII - Principaux radicaux libre oxygéné	30
XIII -Les poids des quatre phases et leurs rendement d'extraction	36
XIV - Le résumé des tests préliminaires des familles chimiques	36
XV -Quelques résultats des analyses préliminaires des quatre phases	38
XVI - Colonies bactériennes étudié	44
XVII -Protocole de travaille	45
XVIII - Les résultats des tests préliminaires	48
XIX - Les résultats de quantification des polyphénols	49
XX - Les résultats de quantification des flavonoïdes	50
XXI - Les concentrations inhibitrices des extraits	52
XXII - Les concentration des extraits correspondant de l'efficacité antioxydant total	54
XXIII - Les résultats de l'activité antibactériennes	55
XXIV -Valeurs du rendement de corrosion et la densité de couverture de surface	56

Abréviations & symboles :

AcOEt : Acétates d'éthyles

ADN : l'acide désoxyribonucléique

b_a : Pente anodique de Tafel

b_c : Pente cathodique de Tafel

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CC : Chromatographie sur Colonne

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CP : Chromatographie sur Couche Mince préparative

COSY : correlation spectroscopy

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

DPPH: 2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl.

E : potentiel

E-P : éther de pétrole

E_{corr} : Potentiel de corrosion

ECS : Electrode au calomel saturé

ER : Electrode de référence

ET : Electrode de travail

E.coli : Escheichia coli

Fe²⁺ : Ions ferriques

FeCl₃ : Chlorure de fer

GC : chromatographie en phase gazeuse

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HO[•] : Le radical hydroxyle

HSQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HMBC ; Heteronuclear Multiple bond Coherence

Hg₂/Hg : Calomel

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide Chlorhydrique

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

I_{corr} : Densité de courant de corrosion

I : courant

I% : pourcentage d'inhibition

KCl : Chlorure de Potassium

K₃Fe(CN)₆: Ferricyanure de Potassium

Malonyle-CoA : coenzyme A

Mg EAG/g : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids sec de la plante.

Mg EQ/g Ps: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante

MeOH : Méthanol

n-but : n-butanol

min : Minutes

mm: Millimètre

nm : Nanomètre

Mm : Millimolaire

NO: Oxyde d'azote

NOESY : nuclear Overhauser effect spectroscopy

O₂^{•-}: Radicalaire anion superoxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONOO[•] : Peroxynitrite

•OH: Radical hydroxyle.

ppm : Parties par millions.

Pseude :Pseudomonas aeruginosa

RMN 2D : Résonance Magnétique Nucléaire 2 didimensionnelle

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RO · : Radical alkoxy

RO^{2·} : Radical peroxy

RO₂H : hydroperoxyde

ROO[·] : radicaux peroxy

RMN H¹ : Résonance Magnétique Nucléaire du **H¹**

Rf: rapport frontal (facteur de retardement)

R% : rendement

ROSY : Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy

SM : Spectrométrie de Masse

Staph :staphylococcus aureus

TAC : total antioxydant activité

TOCSY : Heteronuclear Total Correaltion Spectroscopy

U.V : Ultrat – Violet

ζ :phase

Θ : densité de couverture du surface

λ = logeur d'onde

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale :

La relation entre l'homme et la nature existe depuis de nombreux siècles, et ce lien augmente selon ses exigences notamment dans le domaine de la pharmacie, de la médecine et de la beauté.

La médecine traditionnelle était largement connue et répandue parmi nos ancêtres, en particulier dans les pays du continent Africain, ce qui rendait les chercheurs intéressés par les substances naturels d'efficacité biologique (l'activité antioxydants, antibactérienne, antipaludique). Elles fournissent une source illimitée des grands composés d'intérêt qui peuvent plus loin devenir de nouvelles drogues actives .

La diversité climatique et environnementale conduit à la richesse naturelle des plantes médicinales, joué un rôle principale dans les soins de santé traditionnels dans plus de 80% de la population Africaine vivant dans les régions rurales. [1]

Aujourd'hui les plantes médicinales sont employées comme source de principes actifs très précieux et largement utilisés, ainsi qu'elles constituent une source importante de nouvelles molécules pour l'industrie. [1]

Actuellement environ 25% des médicaments modernes sont développés à partir des plantes. [2]

Quand on parle de la richesse naturelle des plantes médicinales en Afrique, on mentionne particulièrement notre pays l'Algérie.

Les raisons qui ont contribué à l'étude de la médecine traditionnelle en Algérie :

a- La richesse de la flore médicinale . [3] Alors que on compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques en Algérie. [4]

b-La persistance de l'usage des plantes par une proportion importante de la population .[3]

Il est intéressant de noter la concurrence sur se étude, pour cette raison on chercher toujours plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles bioactives .

Le genre Santolina celui une partie de la famille Astéracée ; compte environ 1200 genres et 2600 espèces présentes dans toutes les régions du monde à l'exception des pôles.

Ce genre est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région méditerranéenne .[5]

L'espèce de *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) fait partie de genre *Santolina* croit en Algérie dans les zones humides et semi-humides.

L'espèces de ce genre sont employé traditionnellement dans la médecine en Inde pour le traitement des affections hépatiques, et comme tonique de foie [6] , et son huile essentielles a été largement répandue en tant que médecine folklorique à cause de ses propriétés anthelminthiques, antispasmodiques et emmenogogic . [7]

Les travaux que nous avons effectués sur *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) dans ce cadre sont reportés dans cette mémoire sous forme de quatre chapitres :

- ✓ Dans le chapitre un : on a reportées des études bibliographiques effectuées sur l'espèce étudié.
- ✓ Le deuxième chapitre sera consacré à une étude bibliographique portant sur les métabolites secondaires d'une façon générale.
- ✓ Le troisième chapitre est consacré à nos travaux expérimentaux basés essentiellement sur les activités biologiques, l'extraction, l'isolement et la purification par des méthodes chromatographiques, la purification et l'identification des Flavonoïdes .
- ✓ dans le quatrième chapitre nous offrons l'identification des composés isolés dans le troisième chapitre, ainsi que la discussion des résultats obtenus.

L'ensemble des résultats de nos travaux est terminé par une conclusion générale.

CHAPITRE I

L'ÉTUDE THÉORIQUE DE LA PLANTE

I-1-Introduction :

Santolina africana Jord. & Fourr. (= *Ormenis africana* (Jord. & Fourr.) Litard. & Maire = *Ormenis pseudosantolina* Maire = *Santolina ascensionis* Sennen = *Santolina chamaecyparissus* auct..[8]

C'est un groupe complexe constitué d'espèces botaniques dont la classification chimio- taxonomique est périodiquement révisée . [9]

Santolina africana (Jord et Fourr.) du peloton composite (Asteraceae) est une espèce endémique de la région nord-africaine qui pousse naturellement dans les pentes rocheuses des montagnes. Il a été utilisé depuis l'Antiquité à des fins médicinales, alimentaires et d'épices, et connu pour ses effets curatifs. Il est traditionnellement utilisé pour son effet hypoglycémique ainsi que pour le traitement de la douleur stomacale. Inflorescences de cette plante sont mélangés avec du miel et utilisé pour le traitement de l'ulcère cardialgie et la douleur stomacale .[10]

En Algérie est comporté trois espèces connues :

* *Santolina africana* Jord. et Four. **S. lonadioides* Coss. **S. nobilis* L.J. Gay. .[11]

Santolina africana Jord. et Four. a plusieurs noms vernaculaire en Algérie :

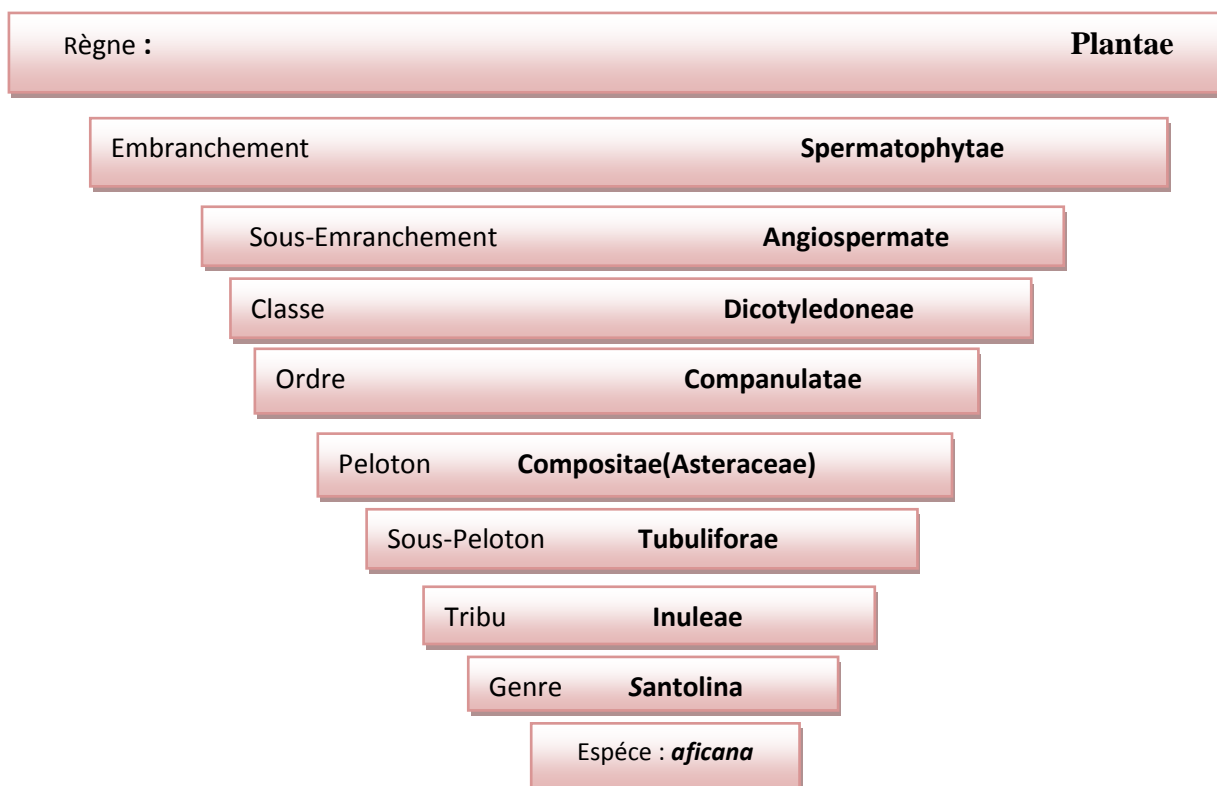
Tamazight : Irezgui ,**Arabe** : Gartofa et **Français** : Ormenis . [12]

I-1-1- Description botanique :

S. africana Jord. et Four C'est un sous-arbrisseau, dense, couleur verte ou grise. Il fleurit en mai-juillet, atteignant une hauteur de 70 cm à odeur forte qui pousse spontanément parmi les rochers, sur les coteaux arides et les crêtes élevées en terrain calcaire. [9,13]

I-2-Classification systématique de la plante *S. africana* [13]:

Tableau I- : Classification systématique de la plante *S. africana*



I-3- Etudes chimiques antérieures sur la plante de *S.africana* Jord. & Fourr :

Des types rares de ont été détecté des métabolites secondaires de *Santolina africana* , en raison de la rareté des études sur ce type, où dont la plupart étaient des huiles essentielles ,des terpénoïdes, des sesquiterpènes . selon notre recherche bibliographique les flavonoïdes plus et des acides phénolique simples ont été détecté dans une seule étude.[14] Les coumarines et les alcaloïdes n'ont jamais été isolés de ce type .

I- 3-1-Les flavonoïdes et les acides phénoliques :

Les flavonoïdes et les polyphénols ont été détectés dans une seule étude, où qu'il a été détectée en utilisant une technique de la photodiodes et l'électro-spray méthode de spectrométrie de masse par ionisation évalué en comparant leurs temps de rétention et les spectres ultraviolets et de masse , Ils sont comme suit :

I-3-1-1-Les flavonoïdes : (Apigenin di-glucoside),(Luteolin 7-O- β -D-glucoside) , (Apigenin 7-O-rutinoside) , (Apigenin 7-O- β -D-glucoside) , (kaempferol glucoside) .

I-3-1-2-Les acides phénoliques : (mono-Caffeoylquinic acid), (Chlorogenic acid) , (Caffeic acid) , (3,5-O-di-Caffeoylquinic acid) , (di-Caffeoylquinic acid isomer)

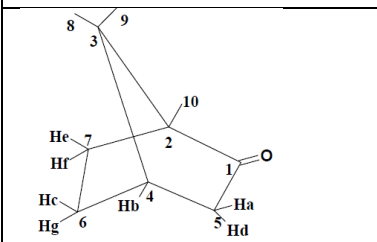
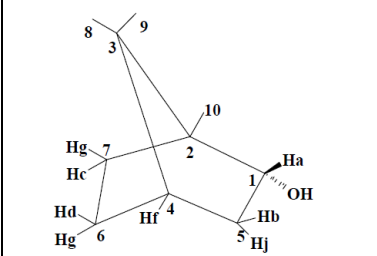
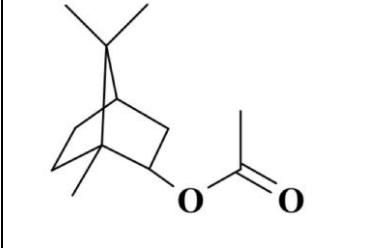
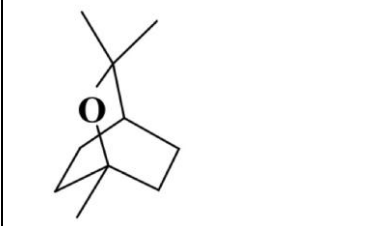
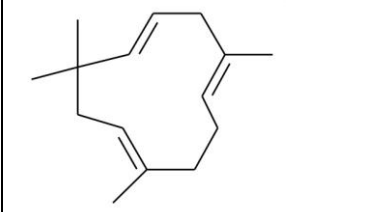
[14]

I-3-2- Les terpènes :

Les terpènes déjà isolés de la plantes S.Africana son des t monoterpènes oxygénés, et un alcool sesquiterpénique sont :

(+)- camphre (1) , (1S-endo)-bornéol (2), acétate de bornyle (3) , 1,8-cinéole (4) , l' α -humulène (5) .

Tableau -II- : les structures des terpènes :

La structure	Nom	Référence
	(+)-Camphre (1)	[9,8]
	(1S-endo)-bornéol(2)	[9,8]
	Acétate de bornyle (3)	[8]
	1,8-cinéole (4)	[8]
	Humulène (5)	[8]

II-3-Les huiles essentielles :

S.Africana est une source riche d'huiles essentielles qui a été utilisée dans de nombreux traitements, la composition des huiles essentielles pour cette plante était peu différente .

La plupart des composants de l'huile essentielle ont été identifiés Par chromatographie en phase gazeuse couplé avec des spectromètres de masse (GC/SM) du genre *S.africana* où le pourcentage de composants dominants était le suivant :

β -eudémol 13.58% ; β -Pinène 12.78% ;1,8- Cinéol 10.02%; curcumène 6.96% ; Myrcène 6.94% ; spathuléol 5.96%. [13]

II-3-4- Propriétés pharmacologiques du *S.africana* :

Les espèces de Santolina sont une source riche d'huile essentielle et les composés polyphénoliques. Les composés phénoliques sont responsables de la santé favorisant des propriétés des produits naturels. On a rapporté que des polyphénols diététiques exercent des effets bénéfiques en multitude des maladies, y compris le cancer, des maladies cardiovasculaires, et de diabète.

II-3-4-1-Utilisation en médecine traditionnelle :

Cette genre de plante a été employée depuis des périodes antiques pour des buts médicaux, de nourriture et d'épice, et connue pour ses curatifs effets .[14]

Elle a été employée dans la médecine folklorique comme vermifuge intestinal contre le strongyloïdose de cheval et comme révulsif de parasite. [15]

II-3-4-2-Quelques activités biologiques reconnues :

Plusieurs analyses ont été fréquemment employées pour évaluer des capacités antioxydants et des propriétés antidiabétiques des huiles essentielles ou des composés phénoliques parfois du *S.Africana* .Où il a été constaté plusieurs capacités antimicrobiennes , antioxydants et antidiabétique . [11 -10- 14]

On constate également que les huiles essentielles de *S.Africana* est très efficace contre une spider (*Tetranychus urticae*) en particulier en présence d'un Réducteur de tension superficielle Tween®20. [16 ,17]

L'extrait aqueuse de Santolina était efficace contre les larves de **Aphis craccivora** .[18]

CHAPITRE 2

LES MÉTABOLITES

SECONDAIRES

II-1-Introduction :

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs industries telles que l'industrie cosmétique, l'industrie agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique. [19]

Les réactions chimiques continues qui ont lieu le protoplasme vivant des cellules végétales donnent lieu, à deux sortes de produits. Les métabolites primaires sont des composés qui ont des rôles essentiels liés à la photosynthèse, la respiration, et la croissance et le développement. Plus le métabolisme secondaire qui est défini comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, Il existe une grande variété de métabolites secondaires pouvant avoir des structures chimiques diverses et complexes et de très nombreuses activités biologiques. On peut citer la capacité à tuer ou inhiber la croissance des bactéries (antibiotiques), des champignons (antifongiques) ou d'autres organismes eucaryotes, tels des protistes ou des helminthes (antiparasitaires). D'autres composés peuvent jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'organisme. Certaines molécules peuvent également servir à la communication entre cellules (quorum sensing). La plupart des métabolites secondaires sont produits par les plantes, les bactéries et les champignons .[20]

En fonction de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois groupes principaux: (1) les terpénoïdes , (2) flavonoïdes et composés phénoliques et polyphénoliques apparentés, (3) les alcaloïdes contenant de l'azote et les composés contenant du soufre [21].

II-2-Les terpènes :

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles .[22] résultant formellement d'un assemblage d'unités « isoprène » (5 carbones) selon un arrangement tête à queue (le plus répandu) ou mixte tête (t) à queue (q) et queue à queue. L'unité isoprène et les arrangements naturels les plus fréquents, soit tête à queue et queue à queue, comme décrit ci-dessous [23] :

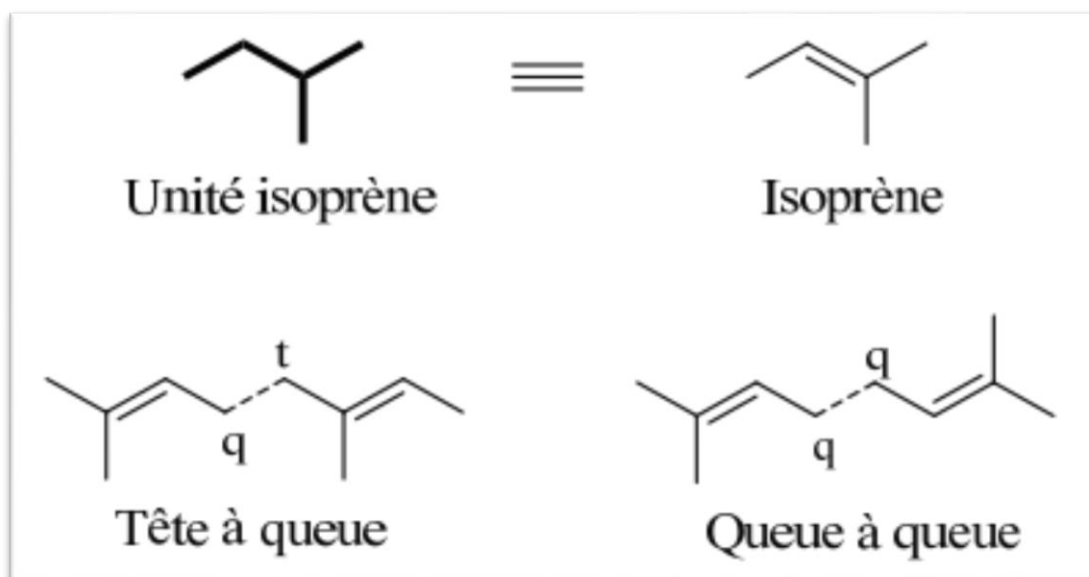


Figure –I- : les arrangements naturels les plus fréquents de l'unité isoprène (tête à queue et queue à queue).

II-3-Les composés phénoliques et les flavonoïdes :

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyle attachés. Plus de **8000** structures phénoliques ont été signalées et elles sont largement dispersées dans tout le règne végétal .[21]

Les composés phénoliques vont de simples composés de faible poids moléculaire à un seul cycle aromatique à des tanins complexes et volumineux et à des polyphénols dérivés. Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'arrangement de leurs atomes de carbone et se retrouvent généralement conjugués aux sucres et aux acides organiques .[21]

II-3-1-Les composés phénoliques :

Tableau –III- : Les classes les plus importantes des composés phénoliques des plantes [24] :

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	Naphtoquinone
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 (C6) n (C6 - C3 - C6) n	Lignines catecholmelanine (tannins condensés)

II-3-2-Les flavonoïdes :

II-3-2-1-Généralité et définition :

Cette catégorie de substances naturelles forme une grande partie des métabolites secondaires d'un grand nombre de variétés de plantes supérieures. Ce sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, formant ainsi l'ensemble des substances les plus répandues. Ils possèdent une diversité structurale très importante .

Près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus et leur nombre ne cesse d'accroître. [25] Par définition, Les flavonoïdes sont des composés C15 qui ont tous la structure C6-C3-C6 où le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent. [26] Sont des molécules responsables des couleurs jaune, rouge, bleue, brune dans les fleurs et les fruits. Tous les organes du système végétal en contiennent, des racines jusqu'aux fruits. Parmi les flavonoïdes, on différencie notamment les anthocyanes, les flavanols, les flavonols, les chalcones et les tanins condensés. [27]

Dans chaque cas, deux anneaux de benzène sont reliés par un groupe de trois carbones. C'est l'arrangement du groupe C3 qui détermine comment les composés sont classés. [28]

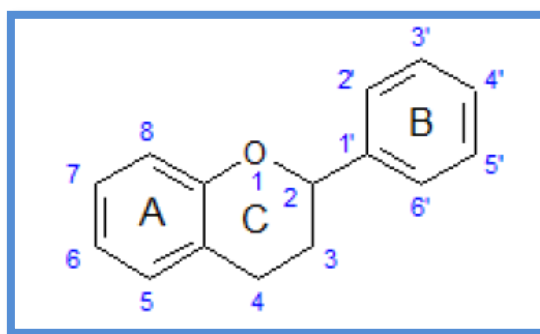


Figure II : Structure de base des flavonoïdes

II-3-2-2-Classification des flavonoïdes :

On permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes selon leur structure de la chaîne centrale à trois carbones, son degré d'oxydation et la position du deuxième cycle (C) qui. À l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette de base se portent sur trois points :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles.
- Le niveau de méthylation.
- Le niveau de glycosylation, parce que ces composés sont fréquemment attachés à des sucres (glycosides), ce qui leur confère un caractère plus hydrosoluble. [29]

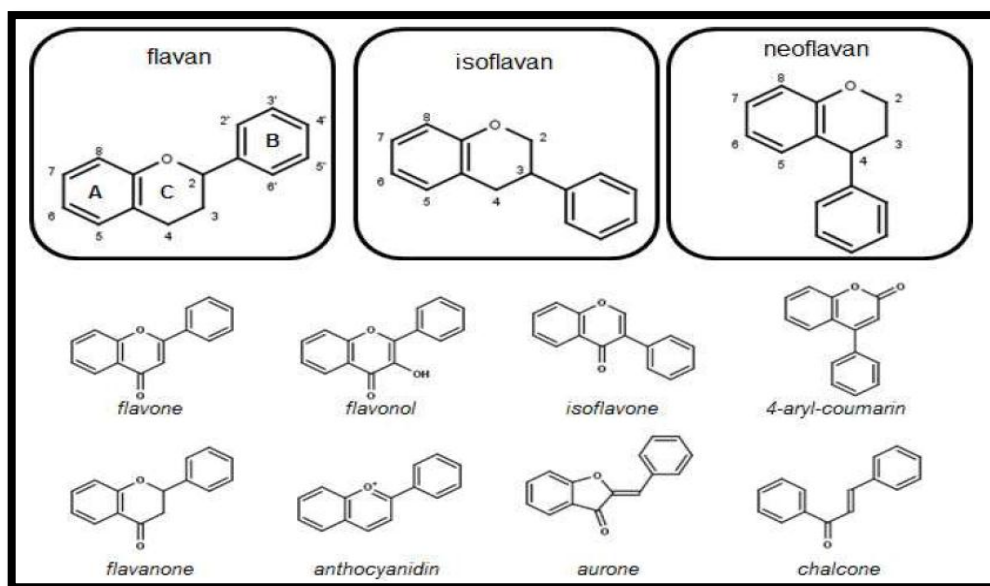


Figure –III- :Structure des squelettes des principaux groupes flavonoïdes et des classes de flavonoïdes pertinentes .[30]

II-3-2-3-Sources des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. Par contre, on les trouve en abondance dans les familles suivantes:

- Polygonacees ,Apiacees (= Ombellifères) ,Rutacees ,Asteracees (= Composées) , Légumineuses .[31]

II-3-2-4-La chimie des flavonoïdes :

II-3-2-4-1-La biosynthèse des flavonoïdes :

Les précurseurs de la plupart des flavonoïdes sont le [malonyl-CoA](#) et le [p- coumaroyl-CoA](#) , dérivant respectivement de la voie métabolique des carbohydrates et des phénylpropanoïdes. Les acides propanoïques (acides en C9) sous leur forme active se condensent avec trois moles de malonate (C6) pour former un chalcone en C15. La fermeture et l'hydratation ultérieures selon le cycle conduisent à la formation des divers flavonoïdes. Ainsi le cycle A des flavonoïdes résulte de la condensation de trois moles de [malonyl-CoA](#) et les cycles C et B sont formés par les acides phénylpropanoïques .[25] La schéma suivant expliquer la voie biosynthétique simplifié des flavonoïdes :

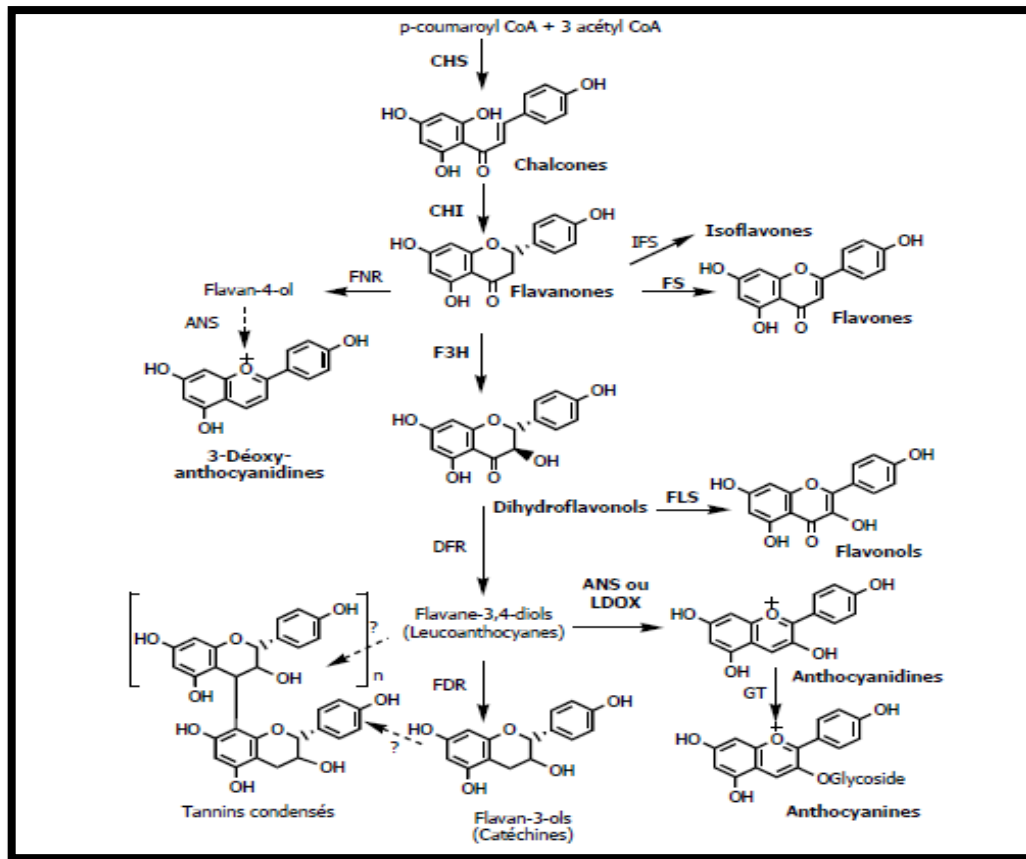


Figure -IV-Schéma : la voie de biosynthèse simplifié des flavonoïdes . [32]

II-3-2-4-2- Propriétés Physico-chimiques des flavonoïdes :

La solubilité :

Les flavonoïdes étant des composés hydroxylés, ils doivent être caractérisés par les propriétés phénoliques des phénols où es hétérosides de flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. La solubilité des flavonoïdes dépend de leur glycosylation. Les aglycones sont plutôt solubles dans des solvants organiques apolaires tandis que les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools .[33, 34]

II-3-2- 4-3-L'extraction :

L'extraction est réalisée après broyage de la plante étudiée, L'extraction classique est réalisée à l'aide de méthanol (éthanol) ou mélange de (méthanol/éthanol -eau) (70/30). il est possible de procéder ensuite par une évaporation sous vide , lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau , de mettre en œuvre une extraction liquide-

liquide par un solvant non miscible à l'eau . [35]Après concentration et élimination d'autant d'alcool que possible .L'extrait est traité avec de l'éther de pétrole pour éliminer :

les graisses, les turbines et la chlorophylle. L'extraction sélective de différents composés est ensuite réalisée.

Tels que différents flavonoïdes et structures polaires, la plupart des solvants utilisés: acétate d'éthyle et butanol, le premier aide à extraire les nombreux glycosides d'hydroxyle et de mono-sucre tout en extrayant , Le deuxième solvant pour de nombreux flavonoïdes et hétérosides de sucre .

II-3-2-4-4-Détection des flavonoïdes :

II-3-2-4-4-1-Tests préliminaires des flavonoïdes :

Avant de commencer le processus de séparation des flavonoïdes, il existe une gamme d'interactions qui permettent la détection des aglycones et les hétérosides dans les extraits bruts par exemples :

Ajouter la solution d'ammoniaque à (3M) : donne un couleur jaune. [36]

- Solution de chlorure d'aluminium 5%: donne des taches jaunes avec des flavonoïdes qui portent OH en position 5 .

-NaOH : donne la couleur orange ou jaune avec tous les flavonoïdes

-H₂SO₄ concentré : donne également la couleur jaune ou orange

- Solution de vanille – HCl 5% : est préparé en ajoutant du HCl concentré à la solution de vanille dans l'éthanol par 1: 4 respectivement et et révèle tous les flavonoïdes où il donne une tache rouge directement ou après le processus de chauffage

- Détecteur de **Neu** : donne une couleur jaune ou orange avec spécial les flavonoles et flavones .[37]

II-3-2-4-4-2-Première détection :

si plusieurs réaction colorées permettent de mettre en évidence génines et hétérosides dans les extraits bruts , l'étude de ces extraits est classiquement dominée par le CCM mono-ou bidimensionnelle le plus souvent sur silice greffée .

L'étude des chromatogrammes peut se faire :

- **directement** : chalcones et aures sont habituellement directement visible sur les chromatogrammes en présence de vapeurs d'ammoniac les taches passent à l'orange et au rouge.

- Le tableau suivant montre les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH_3 :

Tableau –IV- les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH_3 :

Formules chimiques possibles	Tache de couleur sous l'UV	
	En présence de NH_3	En l'absence de NH_3
5-OH Flavones; 5-OH Flavonols (3OR,4'-OH)	Violet-noir	Jaune ou Jaune verdâtre
Flavones ; Flavonols (3-OR, 5-OH, 4'-OH) Flavones (6-OH ou 8-OH)	Violet-noir	Peu de changement ou pas de changement de couleur
Flavones(5-OR) ; Flavonols (3-OR, 5-OR)	Bleu	Jaune verdâtre ou Bleu et vert
Flavonols(5-OH) ; Flavones (3-OH,5-OR)	Jaune foncé ou jaune pâle	Peu de changement ou pas de changement de couleur

- **par une examen** :en lumière ultraviolette avant et après pulvérisation de AlCl_3 avant et après exposition d'ammoniac : la nature et les changements des fluorescences observées donnent un idée sur le type de flavonoïdes présent .

- après pulvérisation d'une solution à **1%** de l'ester du 2-aminoéthanol et de l'acide diphenylborique dans le méthanol , suivi d'un examen en lumière ultraviolette puis dans le visible . On améliore la sensibilité en pulvérisant en plus une solution méthanolique à **5%** de polyéthyléneglycol **400** (= macrogol).

- après pulvérisation de chlorure ferrique , d'anisaldéhyde , d'acide sulfanilique ,diazoté , ou d'autres réactifs généraux des phénol .

- par l'utilisation de réaction ou de propriétés plus ou moins spécifiques :

- réaction- dite de la cyanidine - avec la poudre de magnésium en milieu chlorhydrique (flavanones et dihydroflavonoles) ou avec le zinc dans le même milieu (flavonoïdes stricto sensu .

- réactions des dihydrochalcones , après action du borohydrure de sodum , avec la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

II-3-2-4-5-Séparation et purification :

Les méthodes chromatographiques sont le meilleur moyen de séparer et de purifier les flavonoïdes :

(CC)- Chromatographie sur colonne

(CCM) - Chromatographie en couche mince

(CP) - Chromatographie sur papier

(HPLC) - Chromatographie haute performance

Les plus couramment utilisés sont la (CC) et la (CCM). [38]

Les systèmes de solvants utilisés pour la séparation par la CCM sont :

- toluen/methanol/methylethylketone (4:3:3)

- methanol / methylethylketone / petrolium ether/toluen (7:7 :26:60)

- water/methanol/methylethylketone/acetylacetone (13:3:3:1)

- methanol /acetic acid/ water (18:1:1) .[39]

- n-butanol/acid acetique /eau (BAW) (4 :1:5) . [40]

- acide acétique –conc./HCl/eau (10: 3: 30)

- acide formique-conc/ HCl/eau, (5: 2: 3) . [40]

- chloroforme/méthanol/butanone (9: 4: 2).

-benzène-pétrole / butanone /méthanol (60: 27: 7: 7) . [40]

II-3-2-4-6-Carectérisation structurale :

Les méthodes d'analyse chromatographique doivent être associées à des méthodes physicochimiques en plus de la spectrométrie de résonance nucléaire et de la spectrométrie de masse, pour déterminer la structure des flavonoïdes .

Lorsque les propriétés chromatographiques sont résumées en :

II-3-2 -4-6-1- Facteur de retardement chromatographique :

Qui est la valeur de chaque composé, et peut être déterminée par cette constante pour savoir si le composé aglyconique ou glycosidique savoir si le composé mono-sucre ou binaire ou tri-sucre , il est défini comme suite :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

La valeur du R_f 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 différents substituants sur le squelette flavonique Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f [41] :

Tableau-V- : La relation entre le R_f et la structure flavonique .

Structure flavonique	R_f
Augmentation des groupes Hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux
Méthylation des hydroxyles	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux
Glycosylation	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans le systèmes de solvants aqueux.

II-3-2-4-6-2-Fluorescence sous lumière de Wood :

C'est l'étape important pour l'analyse et l'identification de la structure. Alors le couleur est donné une idée sur la structure , l'absorbance des substances flavonique sous lumière de Wood à la longueur d'onde (365 nm) .

Tableau-VI- : Relation entre la fluorescence et les structures flavoniques sous lumière de Wood

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
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II-3-2-4-6-3-La spectrophotométrie UV-Visible :

Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm . **La bande I** (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau **B**) du flavonoïde et la **bande II** (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle (noyau **A**) comme l'indique le schéma suivant :

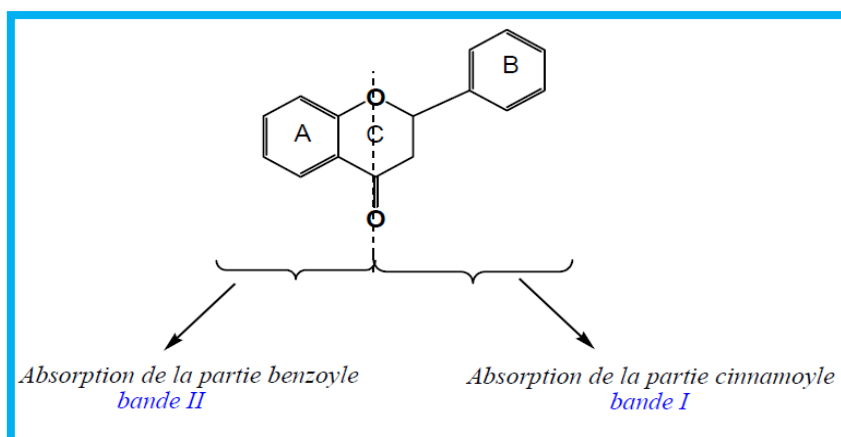


Figure-V- : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique .[41]

II-3-2-4-6-4-Chromatographique et la purification sur la CCM préparatoire :

La région gel de silice contenant des flavonoïdes est grattée et récupérée sous forme de solution en la dissolvant dans du méthanol ou de l'éthanol, afin d'identifier le flavonoïde déjà séparer .[42]

II-3-2-4-6-4-1-Spectre méthanolique ou (éthanolique) :

La spectrophotométrie UV-Visible est basée sur le principe suivant : en milieu alcoolique (solvant standard), chaque famille de flavonoïdes a un spectre d'absorption caractéristique, . L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles .[22,43]

Tableau-VII- Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes :

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330	245-275

II-3-2-4-6-4-2-Addition des réactifs (série spectrale UV) :

Susceptible d'être modifié par l'addition des réactifs. D'après Jurd et al , et Voirin et al, la nature du réactif et l'effet qu'il produit sur le spectre d'absorption apportent des indications sur la structure des flavonoïdes. Les étapes d'enregistrement des spectres en présence de réactifs sont effectuées selon les étapes suivantes :

Première étape : On enregistre le spectre d'absorption dans le méthanol neutre puis immédiatement après l'ajout d'une goutte de NaOH (0,5 N), ensuite on enregistre après 5 minutes.

Deuxième étape : On enregistre une première fois le spectre d'absorption dans le méthanol, puis à cette solution on additionne AlCl₃ (1%) et on enregistre le spectre d'absorption. Après cette opération on rajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (6N) puis on enregistre le spectre de cette nouvelle solution.

Troisième étape : On enregistre dans la solution méthanolique puis on ajoute NaOAc (sec) et on enregistre le spectre, après cette opération on rajoute à cette solution quelques gouttes de solution saturée d'acide borique puis on enregistre le spectre d'absorption. [6]

Les principaux déplacements des bandes **I** et **II** montrée dans le tableau suivant :

Tableau –VIII- : Les principaux déplacements des bandes I et II .[43]

Réactifs	Déplacement (nm)		
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350 330-360 350-385	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol (3-OR) Flavonol (3-OH)
NaOH	+45 à +60 sans diminution d'intensité optique +45 à +60 avec diminution d'intensité optique Apparition d'une nouvelle bande entre 320-335nm		4'-OH 3-OH, 4'-OR 7-OH
NaOAc	+5 à +20 de la bande II Déplacement faible de la bande II		7-OH 7-OH avec substituant en C-6 ou C-8
NaOAc + H3BO3	+12 à +36 de la bande I Faible déplacement bathochromique de la bande I		3', 4' –diOH Orthodihydroxylé sur le noyau A
AlCl3	+30 à +36 de la bande I par rapport au spectre AlCl3+HCl +20 à 40 de la bande I par rapport au spectre AlCl3+ HCl		Orthodihydroxylé sur le noyau B 6, 7 ou 7, 8 di – OH Orthodihydroxylé sur le noyau B
AlCl3 + HCl	+35 à +55 de la bande I +17 à +20 de la bande I +50 à +60 de la bande I		5-OH 5-OH (avec 6-oxygénation) 3-OH ou 3-OH et 5-OH

II-3-2-4-6-5-RMN monodimensionnelle (RMN – 1D) :

Les spectres de résonance magnétique (RMN), qui sont des **RMN H¹** et **RMN C¹³**, ont été largement utilisés Etude et distinction des sectes flavonidiennes.

II-3-2-4-6-5-1 RMN H¹ :

Applications typiques de cette technique aux flavonoïdes inclure la définition du modèle d'oxygénation (tous trois anneaux), détermination du nombre (et de la position) des groupes méthoxyle, distinction isoflavones, des flavanones et dihydroflavonols, détermination du nombre de sucres présent (et si A ou B lié) et la détermination de chaînes latérales hydrocarbonées telles que C lié **CH₃**, et C ou 0-

prényl lié. Le spectre H-RMN apparaît principalement dans plage de 0 à 10 ppm en aval du signal de référence. [44]

II-3-2-4-6-5-1-a- les déplacements chimiques pour différents protons A et B pour les deux anneaux :

Les tableaux suivants montrent les déplacements chimiques les plus importants pour différents protons A et B pour les deux anneaux :

Tableau –IX- les déplacements chimiques les plus importants pour différents protons A et B pour les deux anneaux

Proton du noyau A	H5		H6		H8	
	d, ppm	J,Hz	d, ppm	J,Hz	d, ppm	J,Hz
5, 7 -OH	/		6,0-6,2 d	2,5	6,3-6,5 d	2,5
5-OH; 7-OR(R=Glu)	/		6,2-6,4 d	2,5	6,5-6,9	2,5
7-OR(R=H,sucre)	8,0 d	9,0	6,7-7,1	2,5-9,0	6,7-7,0	2,5
5,6,7-OR (R=H,sucre) 5, 7,8-OR	/		6,3 s		6,3 s	

Proton du noyau B	H2', H6'		H3', H5	
	d, (ppm)	(J,Hz)	d, (ppm)	(J,Hz)
Flavone(4'-OR)	7,7-7,9 d	8,5	6.5 – 7.1 (d)	8.5
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1 d	8,5	6.5 – 7.1 (d)	8.5

II-3-2-4-6-5-1-b-Déplacement chimique de Proton du noyau C :

Le proton H3 dans la Flavone, résonne sous forme d'un singulier dans l'intervalle (6.20-6.40ppm) , e t interférer avec le signal de protons de l'anneau A (H6 ou H8) .

II-3-2-4-6-5-1-c- Déplacement chimique du Protons méthoxyles:

- La présence de méthoxyle ou de plusieurs méthylxylates sur la molécule montrant un ensemble de signaux monovalents confinés entre (3,8 -4.5ppm) . [38]

Remarque : Si les flavonoïdes sont associés à un méthyle ou à un sucre, le déplacement ne se produit pas, donc d'autres techniques peuvent être utilisées pour trouver les emplacements des liens ainsi que pour déterminer la structure finale.

II-3-2-4-6-5-1-d- Déplacement chimique du Protons de sucres :

L'hydrolyse acide des hétérosides :

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes O-glycosylés, elle renseigne sur la position et la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés .[22]

II-3-2-4-6-5-2-RMN C¹³ :

Cette technique permet d'une part d'identifier les atomes de carbone d'un flavonoïde. D'autre part, il est possible d'obtenir des informations sur l'environnement de chaque atome de carbone selon son déplacement chimique. La plupart des signaux **13C** se situent entre **0** et **220ppm**, et le déplacement chimique dépend de l'environnement du carbone dans la molécule.

La technique RMN à une dimension s'est avérée parfois insuffisante où la nécessité d'utiliser d'autre techniques notamment la RMN à deux dimensions .[45]

II-3-2-4-6-6-RMN bidimensionnelle (RMN – 2D) : Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps à savoir le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. le tableau suivant résume les techniques RMN bidimensionnelles les plus importantes utilisées dans la détermination structurale des flavonoïdes de tous les types .[31,37]

Tableau –X- les techniques RMN bidimensionnelles les plus importantes utilisées dans la détermination structurale des flavonoïdes de tous les types .

Corrélations homo-nucléaires		Corrélations hétéro- nucléaires	
COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)	NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)	HSQC ($^1\text{JH-C}$)	HMBC ($^2\text{JH-C}, ^3\text{JH-C}$)
TOCSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)	ROSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)		

II-3-2-4-6-7-Spectrométrie de masse :

Est une méthode physique qui nous permet de déterminer le poids moléculaire du composé, et ainsi connaître la formule chimique totale car nous montrons le nombre et la qualité des substitutions à travers des fragments résultant de la dissociation du composé .Plusieurs techniques sont utilisées pour déterminer le poids moléculaire des composés flavonoïdes, selon la nature des flavonoïdes, notamment:

II-3-2-4-6-7-A-*Pour les flavonoïdes aglycones :

La technologie de l'éjaculation électronique (EI):

C'est le meilleur dans le cas des aglycones et donne au spectre de masse la valeur de l'ion moléculaire $[\text{M}^+]$ et est souvent le pic principal.

II-3-2-4-6-7-B-*Pour les flavonoïdes glycolyses :

-Technique d'éjaculation rapide avec des atomes (F.A.B) :

Préférer dans le cas des hétérosides.

-Technologie électrospray (E.S.I) :

Dans le cas des composées qui se cassent facilement comme : **O-glycoside.**

Technologie d'ionisation chimique (CI) & La technique d'ionisation chimique sous pression (APCI) : a le même principe car les deux reposent sur des réactions ion-molécule .[37]

II-3-2-4-7-Couplage des techniques chromatographiques avec des techniques spectroscopiques [46] :

La couplage **HPLC-UV**, La couplage **HPLC-MS** , La couplage **CPG-SM** , Couplage **HPLC-GC-MS**, Le couplage **CPG-IRT** : Toutes ces technologies sont caractérisées par la vitesse, la précision et la faible consommation du produit.

II-3-2-4-8-Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes :

La lumière , le pH ,la température , la nature du solvant ,la présence d'enzyme, d'ion métallique ,et d'oxydant ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des flavonoïdes [47]. La stabilité des flavonoïdes est affectée par leur structure et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). . Ainsi, l'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont donc moins réactifs [47].

II-3-2-4-9-Le rôle des flavonoïdes physiologiques:

Il existe plusieurs publications sur l'efficacité des flavonoïdes biologiques qui sont classées (bioflavonoïde) . Y compris les suivants :

- Effet contraceptive oestrogénique
- antispasmodique
- il a des effets anticancéreux: les flavonoïdes et les méthoxyflavonoïdes ont un effet anti-nasopharyngé, des tumeurs de la langue de Lewis, un cancer du tissu conjonctif du squelette et un cancer du côlon Les flavonoïdes sont considérés comme des antagonistes Pour les cancers en raison de leur inhibition de certaines réactions enzymatiques.

- effet (chemopreventive)
- Il a des effets antiallergiques
- effet anti-hépatotoxique.[38]
- Certains des flavonoïdes protègent les feuilles de l'agrumes de la maladie du séchage, y compris la prévention de la pourriture dans la plante
- il a effet anti-inflammatoires. [38]
- En plus de ce qui précède, certains flavonoïdes sont utilisés comme analgésiques, anti-ulcères, cholestérol réduit et les diurétiques . [38]

II-3-2-4-10-Les flavonoïdes comme antioxydants :

La capacité des flavonoïdes à neutraliser les radicaux nuisibles et à régénérer la vitamine E dépend de leur structure. Celle-ci doit présenter des fonctions hydroxyles pouvant céder facilement un atome d'hydrogène aux radicaux. De plus, elle doit permettre la délocalisation de l'électron afin de stabiliser le flavonoïde radicalaire et éviter qu'il n'attaque les biomolécules .

Ainsi, les critères structurels permettant un piégeage de radicaux efficace sont :

* Une fonction catéchol. Cette structure est la meilleure donneuse d'hydrogène et elle participe à la délocalisation des électrons.

*La double liaison C2-C3 dans le cycle C conjuguée à la fonction carbonyle en position 4. Elle permet la délocalisation des électrons à partir du cycle B.

* Enfin, les deux fonctions hydroxyles en position 3 et 5 associées à la fonction carbonyle en 4 induisent une efficacité maximale .[48]

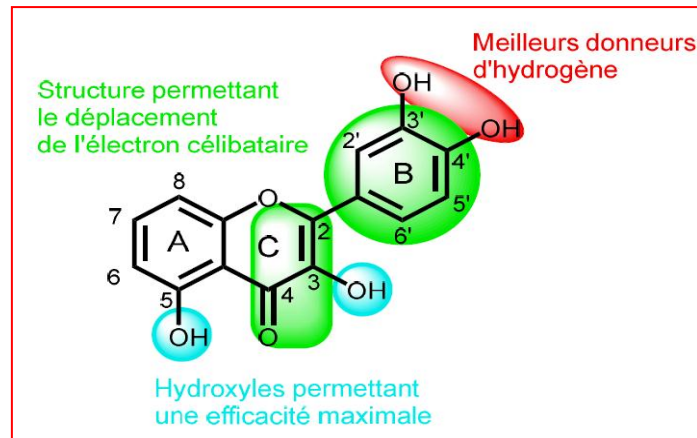


Figure-VI- : Représentation des éléments structuraux des flavonoïdes importants pour la neutralisation des radicaux . [48]

II-3-2-4-11-Distribution et localisation des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, oranges, pamplemousses, et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, brocolis, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones . [24]

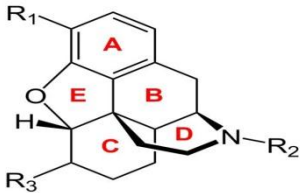
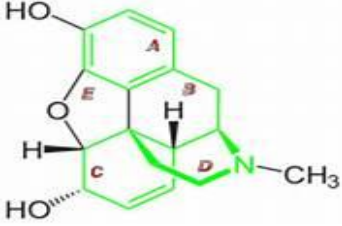
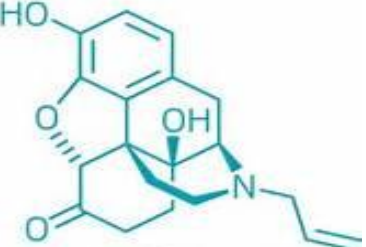
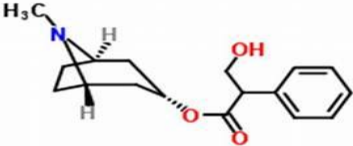
II-4-Les alcaloïdes :

Plusieurs définitions du terme alcaloïde ont pu être données depuis son apparition en **1819**. la plus récente étant celle de **S. W. Pelletier 4 en 1983** : un alcaloïde est un composé organique cyclique contenant un atome d'azote dans un degré d'oxydation négatif qui a une distribution limitée à certains organismes vivants. Cette définition est l'une des plus exactes . [49] Ce jour, plus de 15 000 alcaloïdes différents ont été isolés. La classification des alcaloïdes tient compte de deux paramètres distincts : la position de l'atome d'azote au sein de la structure et les différentes fonctions qui en découlent, et la famille de plantes dont ils sont extraits (90 % des alcaloïdes sont issus de plantes). On compte cinq grandes classes d'alcaloïdes, chacune divisée en plusieurs sous familles : les alcaloïdes hétérocycliques, les alcaloïdes portant un atome d'azote exocyclique, les alcaloïdes de type **putrescine**, **spermidine** et

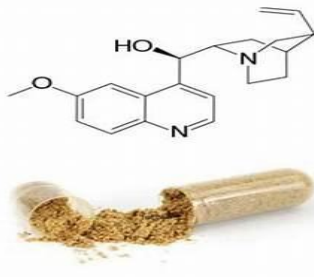
spermine, les alcaloïdes peptidiques et les alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens. La grande majorité des alcaloïdes fait partie de la classe des alcaloïdes hétérocycliques .[50] La plus part possède une activité biologique marquée, qui a suscité depuis longtemps un intérêt thérapeutique . [51]

Le tableau suivant résume quelques alcaloïdes avec leurs indications thérapeutiques :

Tableau XI : quelques alcaloïdes et leurs indications thérapeutiques

Alcaloïde	Structures chimiques	Indications thérapeutiques
Morphine		Produit de référence des Analgésiques (médicaments de douleur)
Codéine Dérivé de Morphine (méthylmorphine)		Analgésique mais surtout un calmant de la toux
Naloxone Alcaloïdes hémisynthétiques se rattachant à la morphine		Toxicomanies
Atropine des daturas		A servi de modèle à une série de médicaments destinés au traitement des spasmes viscéraux

Quinine



Anti malarique et rend encore service dans certaines formes graves du paludisme du à *Plasmodium falciparum*.

CHAPITRE III
RAPPELLES SUR
LES ACTIVITÉS
ÉTUDIÉES

III-1-activités antioxydants :

III-1-1-Stress oxydatif :

Des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif c'est à dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent la plupart des maladies humaines .[52]

III-1-2-Définition de radical libre :

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable il va donc se réduire en oxydant un autre composé .

III-1-3- Espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène. [52]

III-1-4-Les radicaux libres oxygénés :

Tableau XII : Principaux radicaux libres oxygénés. [53]

Radicaux libres	Structure chimique
Radicale hydroxyle	$\bullet\text{OH}$
Radicale alkoxyde	$\text{RO}\bullet$
Radicale hydro peroxyde	$\text{HOO}\bullet$
Radicale peroxyde	$\text{ROO}\bullet$
Radicale oxyde nitrique	$\text{NO}\bullet$
Radicale peroxyde d'hydrogène*	$\text{H}_2\text{O}\bullet_2$
Radicale peroxynitrite	$\text{ONOO}\bullet$
Radicale super oxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$

III-1-5-Conséquence du stress oxydatif :

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéinesetc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus [52].

III-1-6-Définition de l'antioxydant :

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les ROS ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci. Des activités antioxydantes liées aux saponines, aux tri terpènes aux esters gras dérivant tous des plantes ont été reportées. Mais l'activité antioxydante des extraits de plante est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes. Ainsi dans la détermination de l'activité antioxydante d'extraits de plante, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux est aussi déterminée dans le but d'établir une corrélation essentielle entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneur en flavonoïdes et activité antioxydante. [25]

III-2- activité Antibactérien :

La découverte des antibiotiques constituait une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotiques, ont accéléré la sélection de bactéries multi résistantes, constituant actuellement, un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème, sont sérieuses du fait que la plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves, sont de plus en plus difficiles à traiter.

Le recours aux ressources naturelles, en général, et aux plantes médicinales en particulier, devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer, pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces . [54]

III-2-1-Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) :

La méthode de *Vincent* (Aromatogramme) consiste à placer un disque imprégné du composé à tester sur le milieu Muller-Hinton préalablement inoculée avec la souche. Le produit diffuse radialement du disque dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. Après incubation, il se forme une zone ou un halo autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible. Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé . La lecture des résultats se fait par la mesure du Ø de la zone d'inhibition . [55]

III-2-2-Méthode de micro-dilution en milieu liquide :

La méthode de micro-dilution a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (**CMI**).

Le but de cette technique est de déterminer la **CMI** des extraits. Cette technique consiste à inoculer par inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en extraits. Après incubation, la valeur de la **CMI** correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance des microorganismes .[56]

III-3-Activité anticorrosion :

III-3-1-Corrosion des métaux :

Définition :

La corrosion est une destruction non voulue des métaux (détérioration de leurs propriétés) sous l'action d'agents atmosphériques ou réactifs chimiques. Après attaque, les métaux ont tendance à retourner à leur état primitif qui est plus stable par rapport au milieu considéré . [57]

La corrosion des métaux est due à une réaction d'oxydoréduction inter faciale irréversible entre le métal et un agent oxydant de l'environnement.

Métal + Oxydant → Métal oxyde + Réducteur

Selon la thermodynamique, les métaux ne sont pas stables au contact de l'air et de l'eau. La corrosion est donc un processus spontané qui s'effectue dans la plupart des cas sans apport d'énergie d'une source extérieure.

III-3-2- Inhibiteurs de corrosion dans les milieux acides :

Un inhibiteur de corrosion est un composé chimique qui, ajouté à faible concentration au milieu corrosif, ralentit ou stoppe le processus de corrosion d'un métal placé au contact de ce milieu.

III-3-3- Classes d'inhibiteurs :

III-3-3-1- Inhibiteurs organiques

Il existe de très nombreux composés organiques susceptibles d'être utilisés comme inhibiteurs. Ceux-ci contiennent, en principe, un centre actif susceptible d'échanger des électrons avec le métal : l'azote (N), l'oxygène (O), le soufre (S) et le phosphore (P).

III-3-3-2- Inhibiteurs inorganiques :

D'une manière générale, les inhibiteurs inorganiques sont utilisés dans des milieux voisins de la neutralité ou alcalins. Ils agissent soit par formation d'un composé protecteur, précipité en surface, soit en aidant à la formation d'une couche d'oxyde homogène et isolante.

La quasi-totalité des molécules inorganiques inhibitrices contiennent de l'oxygène dans leur formule .

Les classes d'inhibiteurs cités précédemment sont les plus utilisées dans les domaines les plus importants à savoir le décapage/nettoyage des métaux, le traitement des eaux et l'industrie pétrolière.

III-3-4-Produits naturels comme inhibiteurs de corrosion des métaux en milieu corrosif :

L'utilisation des inhibiteurs est l'une des méthodes les plus pratiques pour le contrôle de la corrosion des métaux et alliages qui sont en contact avec un environnement agressif. Différents composés organiques et inorganiques ont été largement étudiés. L'efficacité de ces inhibiteurs de corrosion organiques est liée à la présence de fonctions polaires avec des atomes de soufre, d'oxygène ou d'azote dans la molécule, des composés hétérocycliques et des électrons π . [57]

CHAPITRE IV

L'ÉTUDE

EXPÉRIMENTALE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

IV-1-L'étude phytochimique de la plante *S.africana* :

IV-1-1-Récolte du matériel végétale :

S. africana a été recueillies en mai 2015 dans la région de Biskra (Sud-est de l'Algérie). Il a été séché à l'ombre pendant plusieurs semaines (juste la partie arienne) et gardé à l'abri de la lumière et de l'humidité. La plante séchée a été coupée en petits morceaux.



Figure VII : *Santolina africana* en période de floraison, et la zone géographique à partir de laquelle a été récoltée.

IV-1-2-L'extraction :

Le processus d'extraction a été réalisé selon la méthode utilisée dans la plupart des références visant à extraire les polyphénols et les flavonoïdes. à l'étape de la macération, nous avons utilisé le système eau / éthanol (3/7).Le choix des solvants était selon la disponibilité, le moins chère et moins de toxicité.

Les étapes de l'extraction sont montrées dans le protocole suivant :

(Macération) Plante sèche (227g) : Tremper dans un système (Ethanol / eau)
7/3 (3 fois de 24h à 72) ,filtration

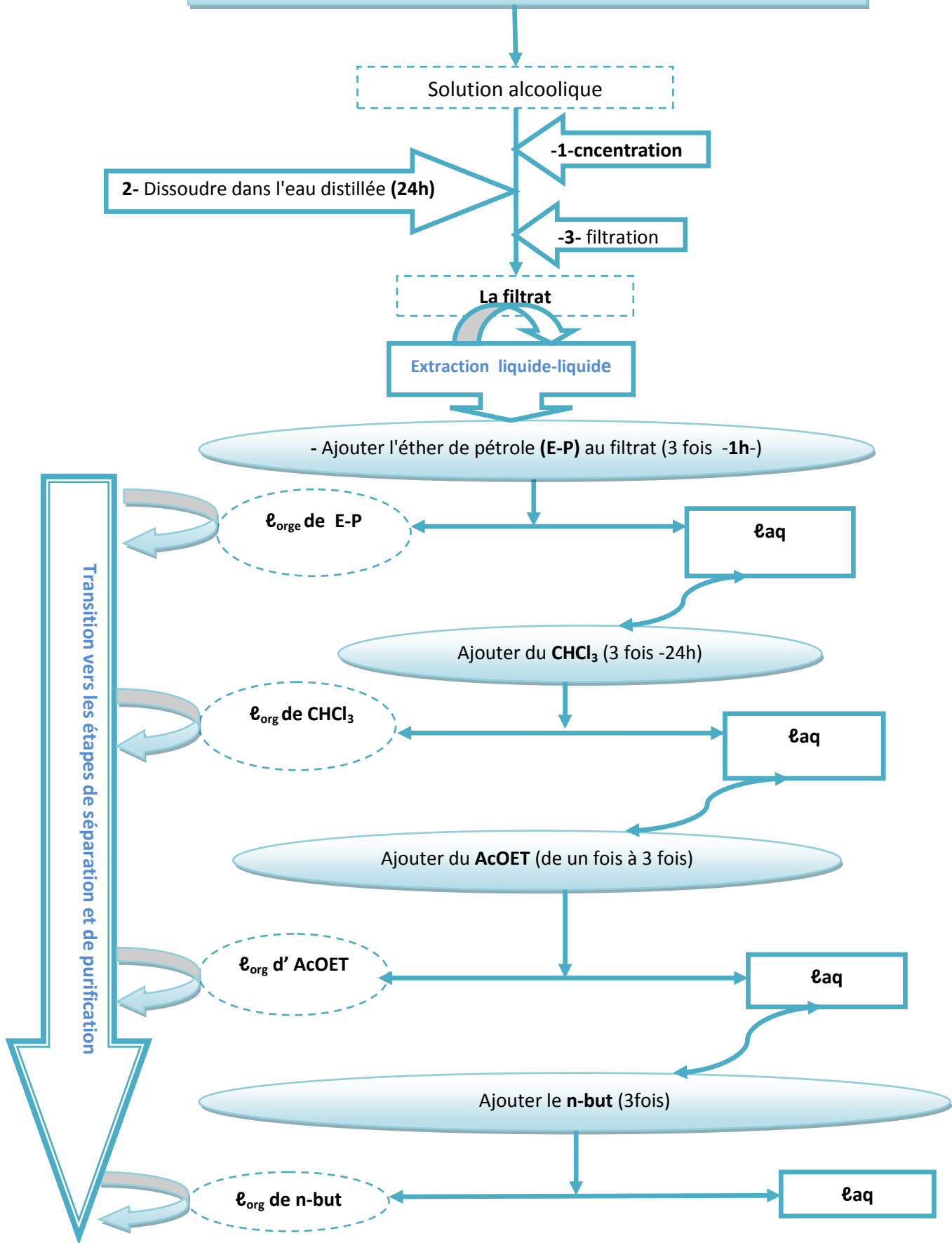






Figure III : protocole d'extraction des polyphénols et flavonoïdes

Le rendement d'extraction est calculé selon la relation suivante :

$$R = \frac{m \text{ extrait}}{m_0} \times 100$$

Tableau XIII : les poids des quatre phases et leurs rendements d'extraction.

La phase	ℓ(Ether de E-P)	ℓ(CHCl ₃)	ℓ (AcOET)	ℓ(n-but)
				
La poids (g)	1.5318	1.268	1.1967	1.5152
Le rendement %	0.4684	0.3877	0.3659	0.4633

IV-1-3- Les tests préliminaires phytochimiques :

L'objectif des tests préliminaires est de détecter les familles chimiques présentes dans l'extrait brut d'éthanol :

Les premiers tests pour détecter les familles chimiques existantes sont très importants: Grâce à ces rapports, nous pouvons voir les différents niveaux métaboliques dans la plante étudiée en ajoutant des réactifs ou des processus sous lumière ultraviolette. Nous avons préparé huit tubes contenant chacun **1 ml** d'extrait brut d'éthanol, Ensuite, nous avons ajouté le réactif approprié pour chaque famille.[58]

Tableau XIV : La résumer des tests préliminaires des familles chimiques .

La famille	La méthode de détection
Alcaloïdes	Ajouter des gouttes de réactif de Dragendrouf Wagner
Flavonoïdes	Ajouter le Hcl concentré +copeau de Mg
Tanins	Ajouter le Fecl₃ 1%
Sucres	Ajouter le réactif de Fehling (A+B)
Saponines	Agitation vigoureusement
Terpènes	Ajouter le CH₃cl +H₂SO₄
Coumarines	Ajouter NH₄OH 10%

IV-1-4-Séparation et pétrification :

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique rapide , simple et moins couteuse ,utilisée au cour de la séparation , purification et de l'indentification des métabolites , elle repose principalement sur la phénomène d'adsorption sélective des composants .

Avant de se lancer dans un processus de la séparation par la **CCM**, nous avons effectué des tests analytiques préliminaires pour déterminer la richesse de chaque phase des métabolites secondaires l'objectif principal est les flavonoïdes bien sûr.

Puisque nous n'avons pas une idée préalable des phases de cette plante, et c'est parce qu'elle est étudiée pour la première fois de cette manière, selon notre recherche bibliographiques, il est nécessaire de pré visualiser les quatre phases pour se concentrer sur les stades les plus abondants de flavonoïdes.

Le processus de séparation a traversé les étapes suivantes :

IV-1-4-1-Préparation de la plaque CCM :

La phase stationnaire : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support d'aluminium (silica-gel , **Merck ,60 GF₂₅₄**) , ou un support en verre de dimension (20cm×20cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5-0.2 mm.

Tout d'abord, on place la ligne de départ à **1 cm** du bord inférieur de la plaque et on la dessine indistinct au crayon puis on posée quatre points jusqu'au nombre de phases que l'on va tester .

La phase mobile : c'est un mélange des solvants.

IV-1-4-2-La cellule chromatographique: c'est un récipient en verre, fermé son taille (25cm × 27 cm), les plaques que nous avons utilisées pour l'analyse initiale ont été utilisées pour les des cellules un peu plus petites. La cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée pour une bonne élution.

IV-1-4-3-Les échantillons : Les échantillons sont : éther de pétrole, chloroforme, acétates d'éthyle, n-butanol qui sont solubilisés dans le méthanol puis déposés en petit spots sous forme de points sur l'absorbant (gel e silice) par pipette

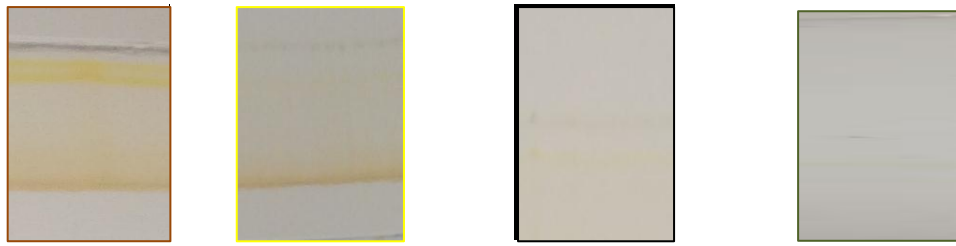
pasteur. La plaque est séchée à température ambiante puis examinée par l'UV (à longueurs d'ondes $\lambda=256\text{nm}$ et $\lambda=365\text{nm}$) et le révélateur (l'ammoniac).

IV-1-5-les analyses préliminaires : Nous notons à partir des résultats préliminaires de l'analyse que la phase de l'éther de pétrole et la phase chloroformique sont riches en produits, contrairement aux phases acétate et bétanolique, les photos montrent les résultats de séparation initiale dans différents systèmes sous la lampe l'ultraviolet, Le tableau suivant montre les images de l'analyse initiale sur les plaques CCM ainsi que les systèmes de solvants utilisés :

Tableau XV : Quelques résultats d'analyse préliminaires pour les quatre phases

Quelques systèmes des solvants utilisés	leurs photos sous la lumière UV $\lambda = 365$	leurs photos sous la lumière UV $\lambda = 256$
n-butanol / acid acétique/ eau (BAW) 4/1/5		
Toulène/CHCl₃/Acetone (8/5/7)		
n-hexane/ AcOET (1/1)		
CH₃Cl /CH₃OH (19.5/0.5)		

Toutes les phases testés ont été exposées aux vapeurs d'ammoniac, les phase de l'éther de pétrole et au chloroforme donnent une coloration jaune qui indique que ces deux phase est riche en flavonoïdes :



⇒ phase E-P ⇒ Phase ChCl_3 ⇒ phase AcOET ⇒ Phase n-but

Figure IX : les quatre plaques CCM qui contiennent les phases organiques après avoir été exposées à la vapeur d'ammoniac.

Les meilleurs systèmes qui ont donné une bonne séparation étaient le système $\text{CH}_3\text{Cl} / \text{CH}_3\text{OH}$ (19.5/0.5) pour les phases éther de pétrole et chloroforme, tandis que la séparation chromatographique des phases acétate et butanolique était très proche et mauvaise dans les différents systèmes de séparation testés.

IV-1-6-Le processus de séparation réel :

Sur la base de ce résultat, nous avons choisi le chloroforme / méthanol (19,5 / 0,5),

On a basé sur la phase chloroformique dans le premier niveau puis la phase éther de pétrole bien que nous ayons conscience de la difficulté de faire la séparation directement sur la plaque CCM avant de faire passer sur la séparation chromatographique sur colonne.

L'utilisation d'un système de séparation de 19,5 / 0,5 ($\text{CH}_3\text{Cl} / \text{CH}_3\text{OH}$) dans une plaque de (5cm × 20 m) dimensions nous a donné le résultat suivant :

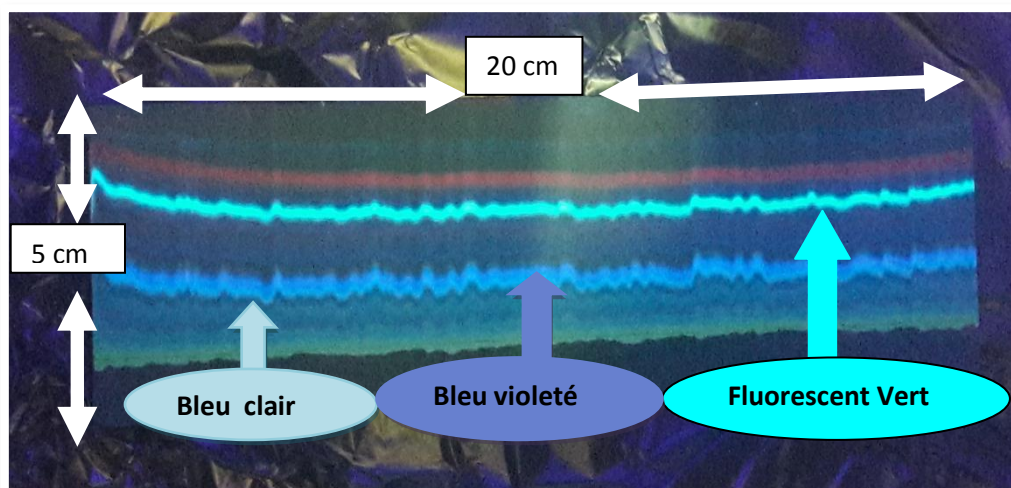


Figure X : photo de la résultat de la séparation de phase chloroformique sous la lampe UV ($\lambda=365\text{nm}$)

Notez clairement les couleurs que nous obtenons sont : **Bleu clair, Bleu violeté et Vert** : sont les couleurs que nous sommes concentrés sur la séparation.

L'étape suivante consistait à gratter chaque bande sur une feuille au-dessus de la feuille d'aluminium par un fil mince, en gardant la zone de couleur à séparer seulement pour obtenir la pureté la plus élevée possible.

Les résultats de la séparation sont visibles dans le chapitre des résultats.

VI-2-Dosage des polyphénols totaux :

Nous avons adopté la méthode de dosage des polyphénols en utilisant le réactif de **Folin-Ciocalteu**.

Principe :

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre **725 et 750 nm** est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux **[59]**

Mode opératoire :

Un volume de **100 µL** des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à **1.5 ml** de réactif de **Folin-Ciocalteu (10%)**. Après **5 min**, **1.5 ml** de carbonates de sodium (6%) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir **90 min** à température ambiante, puis la lecture est faite à **725 nm**. L'acide gallique (**0.03 -0.3 mg/ml**) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage, à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**). **[55]**

La courbe standard de l'acide gallique dans la forme suivant :

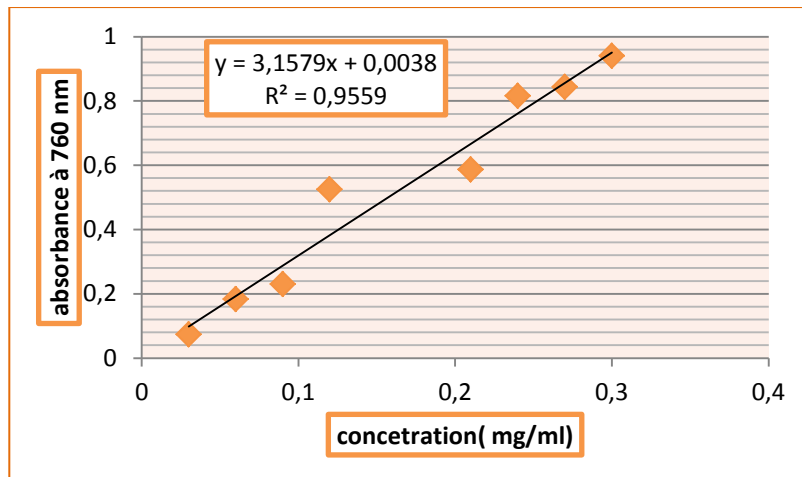


FIGURE XI : La courbe standard de l'acide gallique

VI-3-Dosage des flavonoïdes :

Principe :

Le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes **OH** des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde **415 nm**.

Mode opératoire :

La teneur totale en flavonoïdes dans les extraits bruts de *S.africana* a été estimée en utilisant la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium. Brièvement, **0,5 ml** d'une solution d'éthanol $AlCl_3$ à 2% a été ajouté à **0,5 ml** d'extrait. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à **430 nm** et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercitrine par gramme de poids sec de plante (**mg QE / g**). [60]

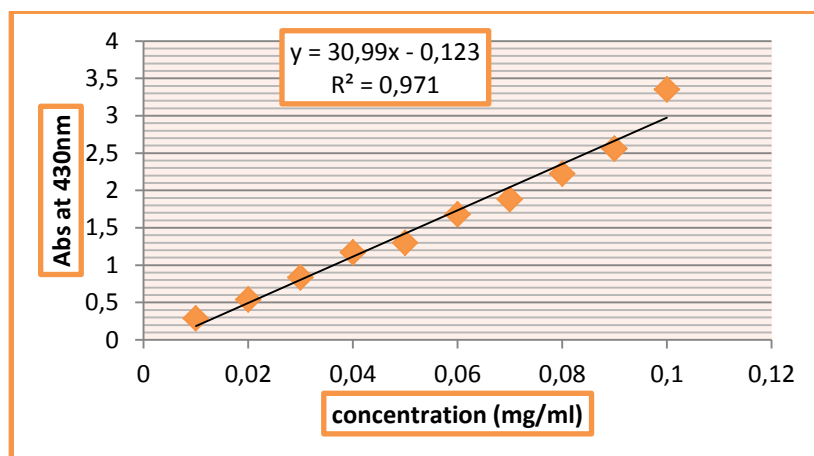


Figure XII : La courbe standard de la quercitrine

VI-4-Étude de l'efficacité antioxydant des extraits :

VI-4-1-Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

Principe :

Le **DPPH** est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre **512 et 517 nm**, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH[•] est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.[61]

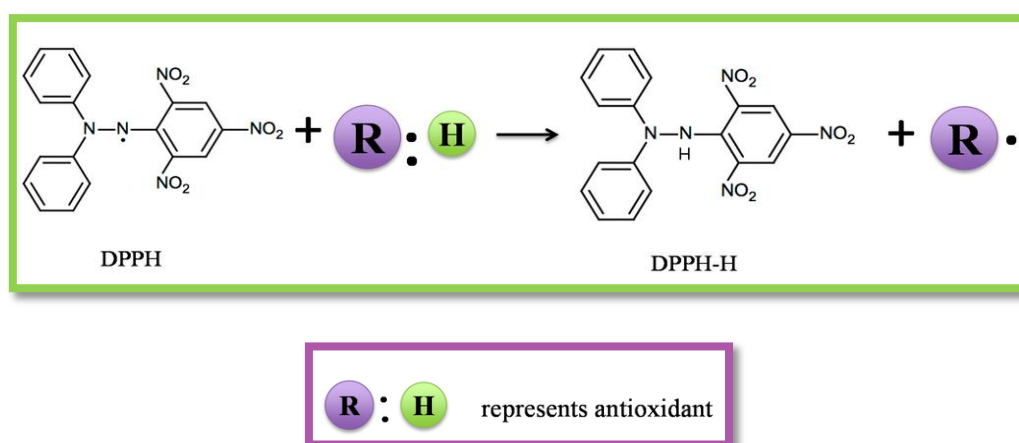


Figure XIII :La méthode de Piégeage du radical libre DPPH[•]

Mode opératoire :

L'activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait a été mesurée en termes de don d'hydrogène ou de capacité de piégeage des radicaux en utilisant le radical libre stable **DPPH** selon la méthode expliquée par *Zhou et Yu* (2004).[62] Différentes concentrations de l'extrait ont été ajoutées à 3,0 ml de solution de **DPPH** 0,1 mM dans du éthanol. Après avoir mélangé vigoureusement les tubes ont été incubés dans l'obscurité. Après **30** minutes, l'absorbance a été lue à **517 nm**. La valeur de **CI₅₀** (la concentration requise pour piéger 50% de radicaux libres de **DPPH**) a été calculée à partir de la courbe de la concentration en fonction de l'activité de piégeage. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.[63] La capacité à piéger le radical **DPPH** a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage de DPPH (\%)} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

*Où A_0 est l'absorbance de la réaction de contrôle et A_1 est l'absorbance en présence de l'échantillon. La concentration inhibitrice de 50% de l'activité racinaire DPPH (IC_{50}) est calculée pour chaque extrait de la courbe d'inhibition (% I) contre la concentration d'extraits :

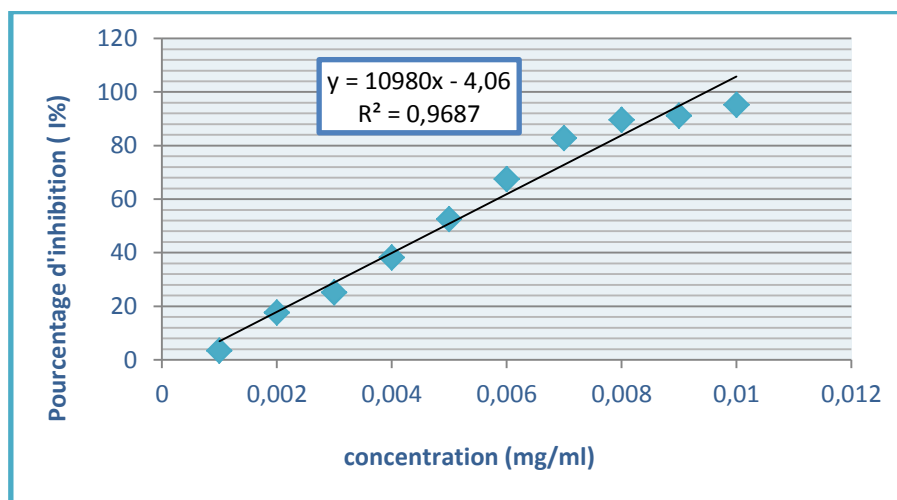


Figure XIV : la courbe standard de l'acide ascorbique

VI-4-2-Activité antioxydant totale (TAC) :

Principe :

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al* (1999)** .[64] Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_4^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

Mode opératoire :

Un volume de **0.3 ml** de chaque extrait éthanolique est mélangé avec **3 ml** de solution du réactif (**0.6 M** acide sulfurique, **28 mM** phosphate de sodium et **4 mM** molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à **95°C** pendant **90 min**. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient **3 ml** de la solution du réactif et **0.3 ml** de l'éthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon .[65] Les expériences sont répétées en **3 fois** .

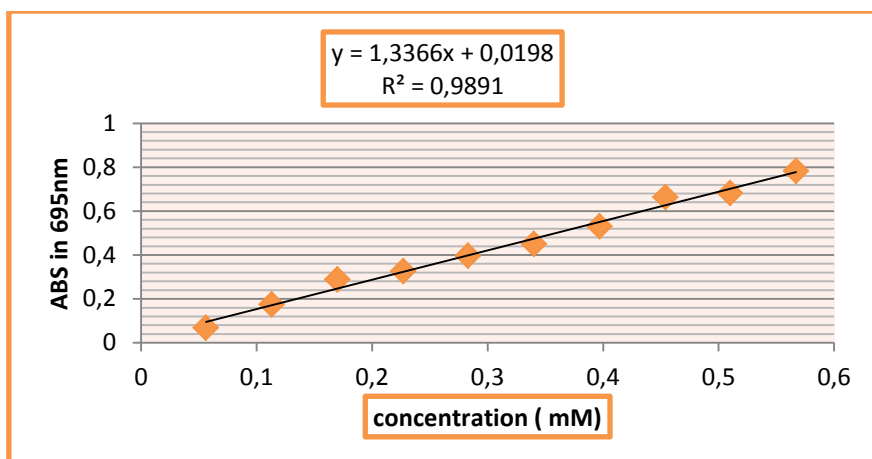





Figure XV : la courbe standard de phosphomolybdène ,

VI-5-Activité antibactérienne :

VI-5-1-Choix des souches : Trois souches de bactéries référence ont été testées obtenu à partir du l'institut *Pasteur* en Algérie :

Tableau XVI : Colonies bactériennes étudier .

La souche bactérie	Petit définition	Photo sous le microscope
<i>Escherichia coli</i> <i>ATCC25921</i>	Bacille aérobie et Gram négatif que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>ATCC29733</i>	Bacille aérobie, Gram négatif et très mobile grâce à un flagelle polaire. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement Il est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales,	
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>ATCC25923</i>	Staphylococcus aureus est Gram positif ubiquitaire qui se révèle être pathogène opportuniste dans certains , aussi responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients .[66]	

Les études antibactériennes ont été évaluées par la méthode de diffusion des disques.[67]

VI-5-2-Préparation des extraits :

Nous avons prendre **0,1 g** de chaque extrait dans **1 ml** de **DMSO**, puis dilué chacun avec des concentrations spécifiques.

VI-5-3-Stérilisation :

Avant de commencer le travail, la surface de travail a été nettoyée avec de l'eau javel, le travail est près d'un bec benzène. Nous avons préparé des disques de 6mm de diamètre de papier **whatman 3** qui a une bonne absorption des extraits, (un forceps + ces disques) sont stérilisent à **120°** pendant **20 min** dans autoclave.

VI-5-4-Les étapes de travail :

Afin de cultiver la bactérie, un milieu **Miller-Hinton** de hauteur **4 mm** a été versé dans des boîtes de Pétri de **90 mm** de diamètre déjà stériles et laissez-le jusqu'à ce qu'il se solidifie à température ambiante ; Notre travail est résumé dans le protocole suivant :

Ensemencement : Les bactéries sont prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile de l'eau physiologique , Il est étalé sur la surface du milieu de manière zigzag , en prenant soin de couvrir toute la surface avec des colonies bactériennes.

Placer les disques et l'incubation : Chacun des lots des disques est plongée dans les extraits les disques ainsi trempés sont séchés dans la température ambiante, par un forceps stérile les sont déposent dans les boîtes de pétri et fermez les. Les boîtes de Pétri sont finalement placées dans un incubateur de 24 heures à 37 ° C .

Les résultats : Plus la zone d'inhibition est grande, plus la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait étudié est grande. Chaque zone peut être mesurée selon divers moyens: règle, compas, pied à coulisse. La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en **mm.**, [68]

Tableau XVII : le protocole de travail

Figure XVI:quelques photos des étapes du travaille



VI-6-L'étude de l'activité anticorrosion :

La méthode de Tafel (courbes des polarisations) :

VI-6-1- Préparation d'échantillons :

L'échantillon à étudier est l'acier **XC52** d'une dimension de **(1,6 cm × 0,75 cm)** de forme cylindrique,. Cet échantillon est raclé avant chaque expérience par du papier verre (400,600,800,1000.1200,1500,2000).

VI-6-2-Appareils et outils usagés :

*Potentiostat **PGZ 301** connecté à un ordinateur avec un logiciel (**Volta master 4**)

* la cellule électrochimique type de **Pyrex** double parois thermostaté de capacité de **500ml** , fournise a Trois fentes permettent l'insertion d'électrodes.

*** les électrodes :**

Electrode de travail (**ET**) : est l'acier **X52** . Electrode auxiliaire (**CE**) : Est un cylindre de platine polie de 1cm² de surface, son rôle est d'assurer le passage du courant électrique dans la cellule électrochimique et l'électrode de référence (**ER**) : qui est une électrode au calomel saturée notée **ECS** en chlorure de potassium (**KCl**), constituée par le système **Hg₂/Hg ; Cl/KCl** . [69]

VI-6-3-Préparation des solutions :

A. Milieu corrosif : le milieu d'étude choisi est (**Hcl 1M**)

B. Solutions inhibitrices : 0.05 g de l'extrait éthanol brut dissoudre in 1000ml de **Hcl (1M)**, l'action de cet inhibiteur a été testée pour plusieurs concentrations (**1-25ppm**).

VI-6-4-Mode d'opérateur :

Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales pour travailler sur l'ordinateur sont activées :

Les courbes de Tafel ont été obtenues en changeant automatiquement le potentiel d'électrode de **-300 à +300 mV** par rapport au potentiel du circuit ouvert à une vitesse de balayage de **0,2 mV / s**.

On prépare la cellule et l'électrode de travail .

Donnez des ordres à l'ordinateur de logiciel (**Volta master 4**)

Les courbes sont tirées : $f(t) = E$; $I = f(E)$.

Avec l'aide de logiciel d'*Excelle* ou *l'origine 6* , nous dessinons les courbes qui les accompagnent : $\text{Log}(i) = f$, Qui représentent les courbes du **Tafel** .

Le tracé des courbes intensité-potentiel permet de déterminer le potentiel de corrosion (**E_{corr}**), la résistance de polarisation (**RP**), la densité de courant de corrosion (**I_{corr}**), les pentes cathodiques (**bc**) et anodiques (**ba**) de **Tafel** et par conséquent le taux d'inhibition dans les conditions opératoires utilisées. [54]

Le rendement de corrosion ainsi que la densité de couverture de surface ont été calculés à partir des deux relations. [70]

$$\boxed{R \% = \frac{i_{corr} - I_{corr}}{i_{corr}}} \quad , \quad \boxed{\theta = R / 100}$$

i-corr: Courant de corrosion en l'absence d'inhibiteur.

I_corr: Courant de corrosion en présence d'inhibiteur.

R%: Rendement d'inhibition.

Θ: Rapport de couverture de surface.

E: potentiel.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

V-1-L'étude phytochimiques:

V-1-1-Les tests préliminaires :

Les données préliminaires ont montré la présence de la plupart des familles chimiques dans l'extrait éthanolique brut, ce qui indique que la plante étudiée est riche en métabolites secondaires, en particulier les tanins, les coumarines et les terpènes.

Tableau XVIII : résultats des tests préliminaires

La famille	Le résultat
Alcaloïdes	
Flavonoïdes	+
Tanins	++
Sucres	++
Saponines	
Terpènes	++
Coumarines	++

(-) négative =l'absence de cette famille .

(+) Positive =la présence moyenne de cette famille.

(++) positive =la présence de cette famille est très répandue.

V-1-2-Résultats de la séparation et purification :

Après avoir terminé le processus de grattage des bandes de la plaque CCM, nous obtenons le gel de silice qui porte le produit isolé .Pour tester la pureté des produits isolé , nous avons fondu la poudre dans le moins de méthanol possible et filtré à travers le puits de coton.

Le filtre est un poudre de gel de silice, le filtrat représente le composé obtenu dissolvé dans le méthanol, où nous l'avons analysé dans plusieurs systèmes des solvants , les résultats obtenu sont :

Le seul composé pure selon les possibilités utilisées était le composé de couleur bleue séparé de la phase chloroformique.

Un composé similaire a été séparé de la phase chloroforme et d'acétate d'éthyle, pour s'assurer que le même composé qu'avait déjà obtenus, on a calculé le R_f pour chacun de ces composés.

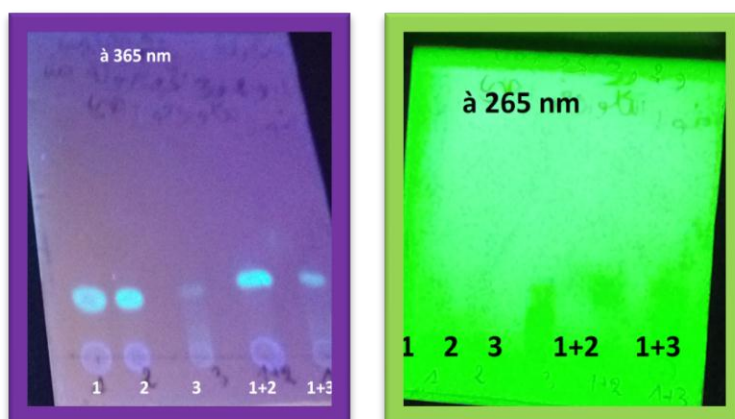


Figure XVII : le résultats de la séparation de tris échantillons

L'échantillon 1 : représente le produits de séparation de la phase chloroformique

L'échantillon 2 : représente le produits de séparation de la phase acétates d'éthyle

L'échantillon 3 : représente le produits de séparation de la phase éther de pétrole

Les valeurs de R_f pour les échantillons **1** et **2** sont les mêmes (**1,5 cm**) C'est pourquoi nous avons mélangé les deux produits dans le même tube pour obtenir une grande quantité dans lequel il était séché pour afin de travailler sur sa détermination structurelle à l'avenir.

Remarque:

Le processus de séparation était basé sur le plus grand nombre possible d'échantillons et portait surtout sur les flavonoïdes, mais aucun échantillon pur n'a été obtenu.

V-1-3-Les résultats de l'estimation quantitative :

V-1-3-1-Dosage des polyphénols totaux :

Le résultat est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**) .

Tableau XIX : le résultat de quantification des polyphénols

extrait	E-P	CHCl ₃	AcOET	n-but
quantité des polyphénole(mg/g)	6,2855±0.02	5,3651±0.6	43,6454±0.2	123,3875±0.01

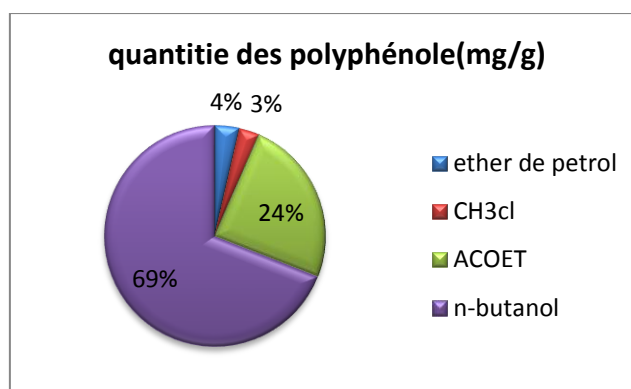


Figure XVIII : le pourcentage de la quantification des polyphénols de chaque phase

On a noté que la phase n-butanol contient la plus grande quantité de poly phénols suivie de la phase acétate d'éthyle puis la phase d'éther de pétrole et le chloroforme, ces résultats sont liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires.[71]

V-1-3-2-Dosage des flavonoïdes :

les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercétine par gramme de poids sec de plante (**mg QE / g**).

Tableau XX : le résultat de quantification des flavonoïdes

extrait	E-P	CHCl ₃	AcOET	n-but
quantité des flavonoïdes (mg/g)	25,61±0.858	6,3±0.06	1,71±1.32	9,97±0.573

Pour les résultats de l'estimation quantitative des flavonoïdes, la phase de l'éther de pétrole était le pourcentage le plus élevé, ce qui nous amène à nous concentrer davantage sur ces derniers dans d'autres études et non sur la négligence, suivie de la phase de butanolique , chloroforme et l'acétate .

A noter que la phase de l'éther de pétrole est riche des produits qualitativement et en quantitativement Ces résultats confirment les résultats obtenus lors de l'analyse initiale des phases par les plaques CCM.

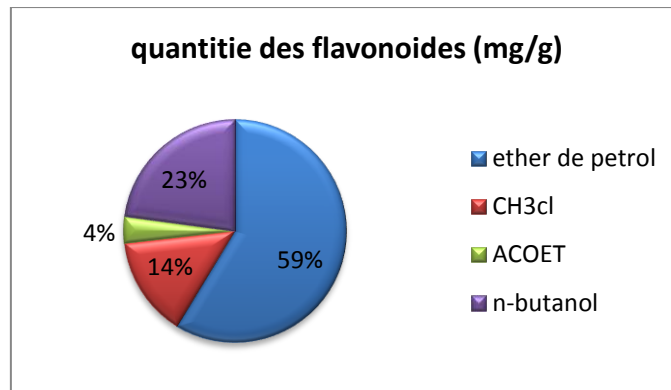
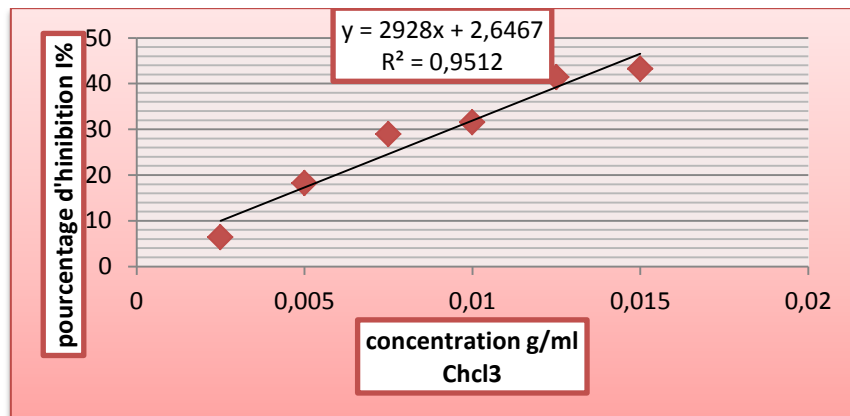
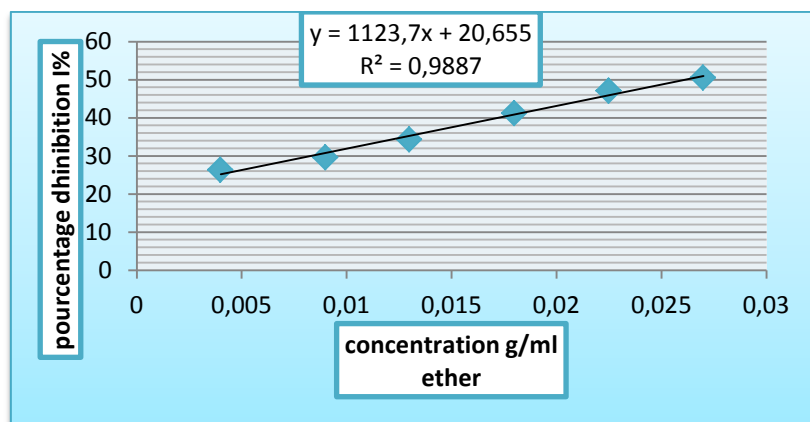


Figure XIX : le pourcentage de la quantification des flavonoïdes

V-1-4-Les résultats de l'étude de l'activité antioxydant :

V-1-4-1-Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) :

Les courbes illustrées dans la figure nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical **DPPH** en fonction de la concentration des antioxydants .



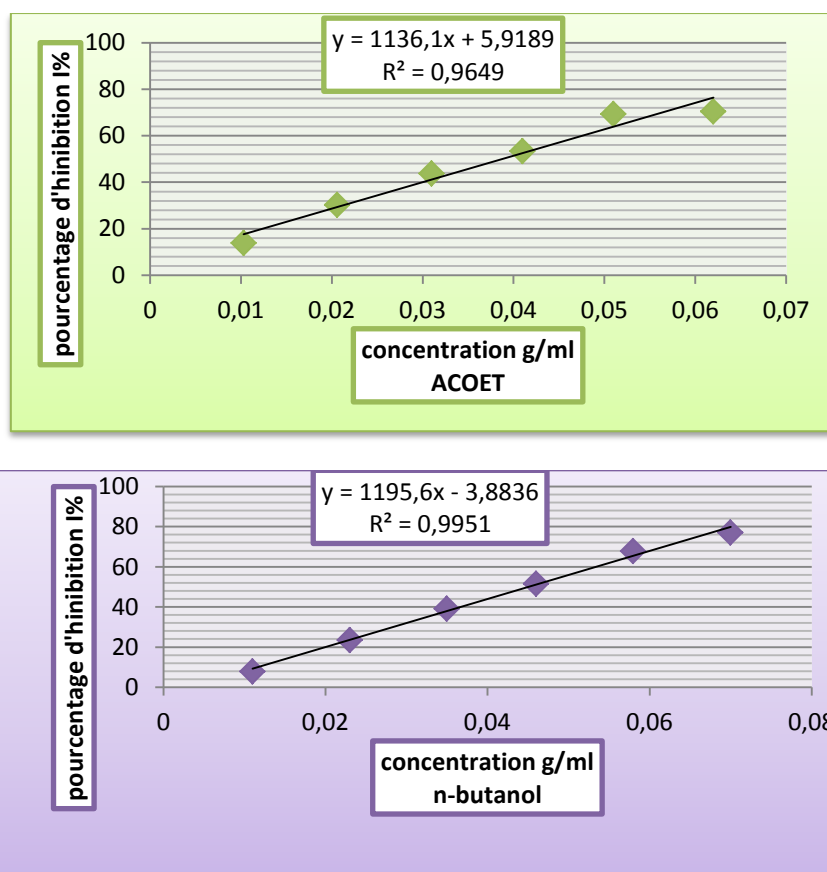


Figure XX : les courbes de pourcentages d'inhibition des extraits de *S.africana*

La valeur IC_{50} de chaque phase a été calculée et les résultats traduits dans le tableau suivant :

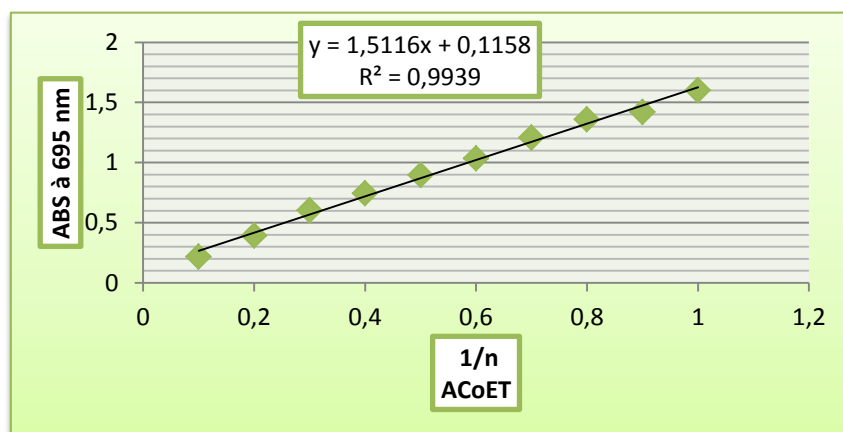
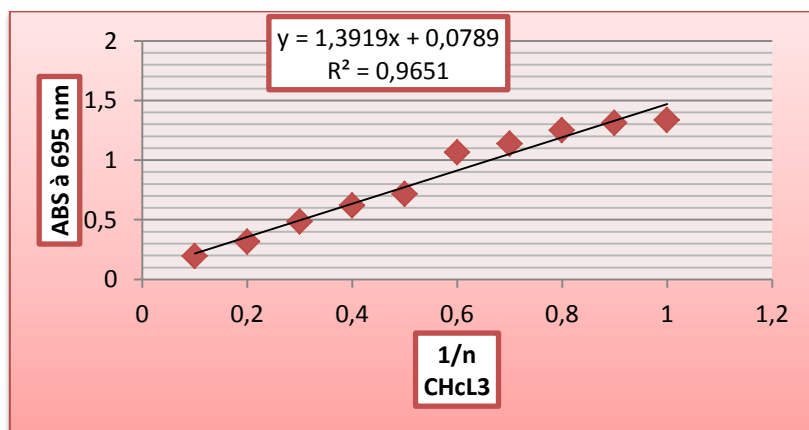
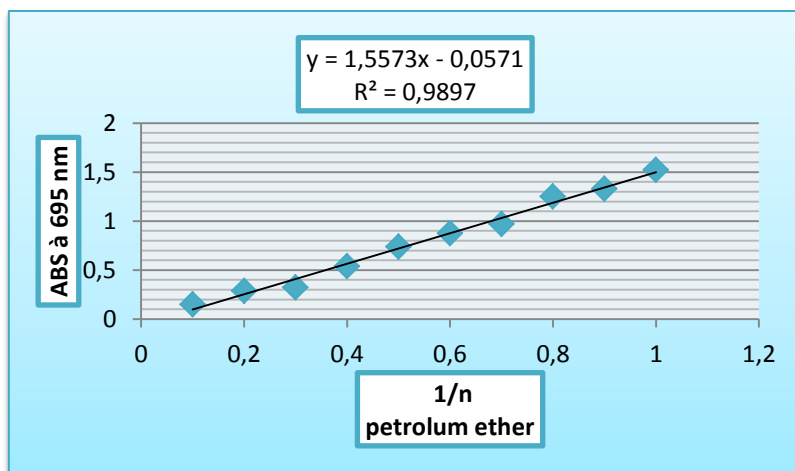
Tableau XXI : les concentrations inhibitrices des extraits in 50 %

Extrait	Acide ascorbique	E-P	CHCl ₃	AcOET	n-but
$IC_{50}(mg/ml)$	0.04923 ± 0.02	0.02613 ± 3.112	0.01617 ± 2.13	0.03880 ± 0.87	0.04509 ± 0.02

Les résultats de l'évaluation de l'efficacité antioxydant ont montré que la phase butanol avait une valeur proche à la valeur de l'acide ascorbique suivie de la phase Mais dans ce cas, nous cherchons la concentration la plus faible, pas la plus grande concentration qui inhibe les radicaux libres . La phase chlorophormique a donné la concentration la plus faible possible pour inhiber 50% des radicaux libres ,Ces résultats sont en accord avec les valeurs quantitatives des flavonoïdes . Nous savons que les phénols et les flavonoïdes sont les principaux responsables pour l'activité antioxydant dans les extraits de plantes .[72] En accord avec les résultats de nombreux chercheurs le mécanisme d'interaction entre les composés antioxydants et la racine de DPPH est sa structure chimique ainsi que le nombre de groupes hydroxyles qu'elle contient .[73]

V-1-4-2- Activité antioxydant totale (TAC) :

Les courbes d'absorption ont été tracées en termes du nombres inverse de dilution .



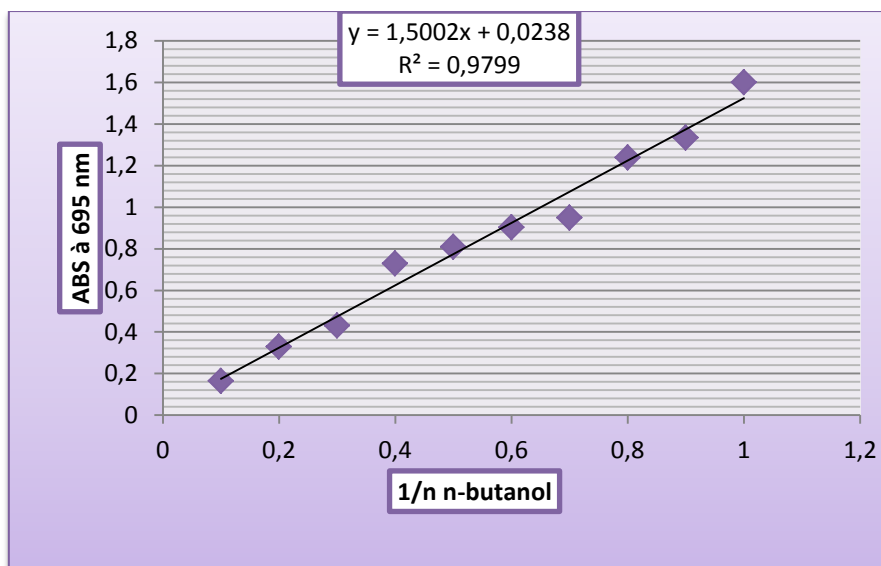


Figure XXI : les courbes de la capacité totale antioxydant des extraits

La valeur **TAC** été calculée par l'inverse du nombre de dilutions et des résultats est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau XXII : les concentrations des extraits correspondants de **TAC**

Extrait	E-P	CHCl ₃	AcOET	n-but
TAC (mM)	1.160±1.3	1.045±0.33	1.130±0.7	1.227±0.02

Nous notons que les résultats de la capacité totale d'efficacité antioxydant correspondent grossièrement aux résultats de l'estimation quantitative des polyphénols , nous trouvons le rapport le plus élevé de la phase du n-butanol et de l'éther de pétrole suivi par la phase acétyle et finalement la phase chloroforme.

V-1-5-résultats de l'Activité anti bactérienne :

Tableau XXIII : résultats de l' Activité anti bactérienne

Diamètre d'inhibitrice (mm)			Concentration Mg/ml	
E. coli	Staph	Pseudo		
-	4.5	-	A=100	Extrait brut
-	4.3	-	B=50	
-	-	-	C=25	
-	4	-	A=100	Extrait aqueuse
-	7	-	B=50	
-	5	-	C=25	
-	12	-	A=100	E-p
-	9	-	B=50	
-	9	-	C=25	
-	-	-	A=100	CHCl ₃
-	-	-	B=50	
-	-	-	C=25	
-	-	-	A=100	AcOET
-	7	-	B=50	
-	9	-	C=25	
-	10	-	A=100	n-but
-	-	-	B=50	
-	-	-	C=25	

Les résultats ont montré que l'extrait d'éther de pétrole donnait l'inhibition de diamètre le plus élevé entre tous les extraits jusqu'à (12 mm) à la concentration de 100 mg / ml contre les *Staphylococcus aureus* suivie de l'extrait de l'extrait butanolique à base d'eau puis l'extrait d'acétate puis l'extrait d'eau et l'éthanol brut. Quant aux deux espèces restantes, aucun extrait des extraits n'a donné de résistance contre ces colons (**E. Coli** , **Pseudomonas auroginisa**).

Quelques images des résultats de travail obtenus :

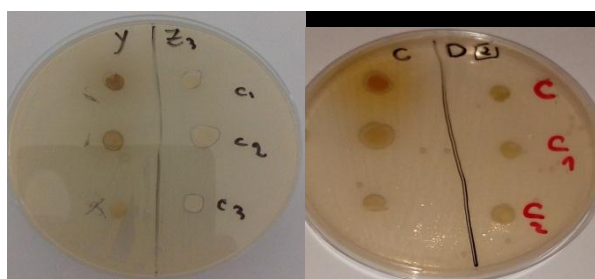


Figure XXII : images des résultats de l'activité antibactérienne

V-2-Résultats de l'activité inhibitrice de la corrosion:

A noter qu'après l'addition de l'extrait, la vitesse de corrosion diminue dans le milieu acide, accompagnée d'une augmentation du rendement de corrosion R%. La diminution de la densité de courant est due à l'adsorption des molécules inhibitrices sur la surface de l'acier doux. réaction de corrosion de l'électrode.

Tableau XXIV : Valeurs du rendement de corrosion et de la densité de couverture de surface .

Concentration de extrait brut (ppm)	E(i=0)mv	Rp (ohm.cm)	i(corr) (mA/cm ²)	Ba (mA)	Bc (mA)	V-corr(uA/γ)	R %	Θ
0	-546,2	104,29	0,9726	186,5	-167,9	2,019	0	0
1	-529,9	86,75	0,7323	163,7	-155,2	8,565	24,7069	0,247069
2.5	-534,7	101,51	0,6177	160,2	-157,8	7,224	36,4898	0,364898
5	-534,6	91,28	0,553	162,6	-196,3	6,468	43,142	0,43142
10	-537,6	98,23	0,5125	144,3	-184,8	5,994	47,3061	0,473061
15	-524,6	91,26	0,4919	132,1	-184,1	5,753	49,4242	0,494242
20	-512,2	91,3	0,3938	116,8	-165,4	4,606	59,5105	0,595105
25	-481,5	132,91	0,3231	155	-195,2	3,779	66,7797	0,667797

Les résultats se traduisent par des courbes comme suit :

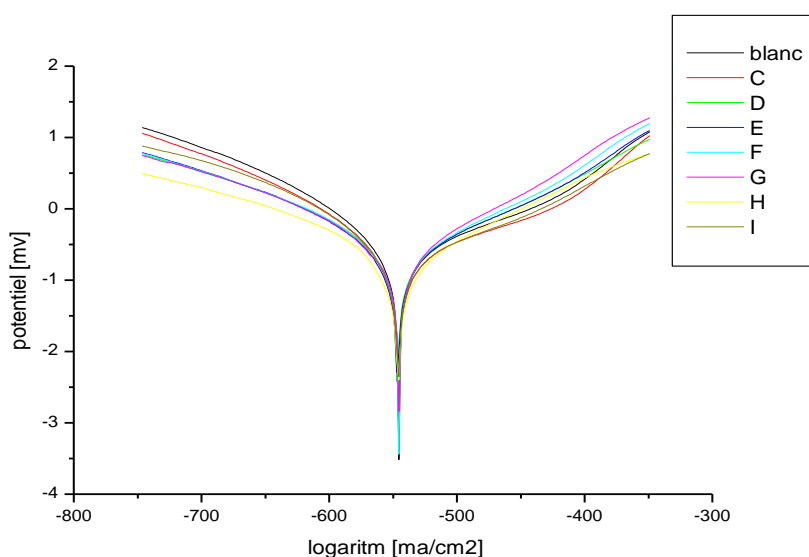
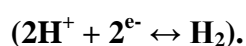


FIGURE XXIII : Représentant les courbes de **Tafal** pour différentes concentrations de l'extrait brut.

Selon *Ferreira et al.* [74], si le déplacement du potentiel de corrosion (E_{corr}) est supérieur à **85 mV** par rapport au potentiel de corrosion (E_{corr}) de la solution témoin, l'inhibiteur peut être vu comme un type cathodique ou anodique. Dans cette étude, le déplacement maximal était de **65,2 mV** anodiquement par rapport à l'ébauche. Ceci indique que l'inhibiteur étudié se comporte principalement comme un type anodique. [75] Notre inhibiteur réduit la dissolution anodique de l'acier (décrit par la réaction) ($\text{Fe} \leftrightarrow \text{Fe}^{+2} + 2e^-$) et retarde l'évolution de la décharge cathodique des protons μ



Le mécanisme de cette inhibition est fait en formant une couche de l'extrait de l'acier allié, qui est où empêcher l'oxydation du fer au milieu de **Hcl**.

Nous pouvons également dire que cette force inhibitrice est due en partie à l'activité antioxydant des flavonoïdes présents dans notre synthèse selon une étude.[76]

Conclusion Générale :

Les plantes sont devenues la principale source de substances actives utilisées pour l'industrie pharmaceutique et les sciences aujourd'hui ne manquera pas une opportunité à l'étude de l'efficacité des plantes.

Dans ce domaine, nous avons cherché à étudier différents aspects de l'efficacité des plantes *Santolina africana* Jord. & Four.

Le processus d'extraction liquide-liquide qui produisait le rendement le plus élevé dans la phase d'éther de pétrole suivie par la phase de chloroforme, tandis que les tests initiaux pour les familles ont montré que la plupart des familles chimiques étaient présentes.

L'analyse qualitative des différentes phases a montré qu'il celui-ci est riche de composés métaboliques secondaires, puis nous nous sommes concentrés sur la séparation processus tests précédé par une analyse initiale nous a fait l'accent sur la phase d'éther de pétrole et la phase de l'acétate d'éthyle où nous avons essayé de séparer les flavonoïdes comme un objectif majeur, mais nous ne nous obtenons sur les produits purs, alors que nous obtenons un composé pur de couleur bleue.

En plus d'essayer de séparer plusieurs échantillons mais ils n'étaient pas purs.

Nous exploitons également des méthodes spectroscopiques afin d'estimer la teneur en phénols des flavonoïdes totaux et l'étude d'antioxydant efficace, où ces études ont donné liées aux résultats les uns aux autres, nous avons constaté que la phase

n-butanol a la plus forte proportion des phénols totaux d'une part, et a donné le pourcentage le plus élevé d'inhibition pour tester l'efficacité des résultats de l'antioxydant totale d'autre part ; la plus forte teneur en flavonoïdes a été développée dans l'éther de pétrole, le teste l'efficacité de d'inhibition pour la radicale libre de DPPH qui a développé la phase chloroformique l'efficacité la plus élevée.

Le test d'efficacité antibactérien effectué sur trois souches a montré que le plus haut diamètre de la zone d'inhibition était la phase d'éther de pétrole contre la *Staphylococcus aureus*.

L'étude de l'effet anticorrosion de l'extrait d'éthanol brut a montré la capacité de cet extrait à réduire de fer le pourcentage d'érosion dans un milieu acide.

Référence :

Les références étrangères :

- [1] Sanago, R. (2006). "Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle." Université Bamako (Mali) **53**, 1p.
- [2] Chibani, S. (2013). "Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien."
- [3] Baba Aissa Farid .(1990) Les plantes médicinales en Algérie , LE MONDE DES PHARMACIENS ,3p.
- [4] Gaussen, H. and H. Leroy (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed, Masson,2p.
- [5] Boudjerda, A. (2013). "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de *Achillea ligustica* (Anthemideae), et *Ranunculus cortusifolius* (Ranunculaceae)."
- [6] Youssef, M. A. (2006). Plantes médicinales de Kabylie, Ibis Press.
- [7] Garg, S., D. Gupta, et al. (2001). "Volatile Constituents of the Essential Oil of *Santolina chamaecyparissus* Linn, from the Southern Hills of India." *Journal of Essential Oil Research* **13**(4): 234-235,234p.
- [8] Rabiaa, F., I. LMACHRAA, et al. (2011). " huiles essentielles des partie aériennes de *Santolina africana*." *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **150**(1-4): 47-60, 4p.
- [9] Lmachraa, I., R. Fdil, et al. (2014). "Huile essentielle de *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) du Maroc: Composition chimique et isolement des deux principaux constituants." *J Mater Environ Sci* **5**(1): 67-72, 67p.
- [10] A. Béjaoui, A. Boulila, I. Mahouachi, M. Boussaid, Metabolic profile of the bioactive compounds of *Ormenis africana* Jord. and Fourr. (Asteraceae) an endemic species from Tunisia, *International Journal of Advanced Research* .,2013, 1(9), 124-131, 125p.

- [11] Derouiche, K., A. Zellagui, et al. (2013). "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Santolina africana* flowers, endemic in Algeria." *Journal of BioScience & Biotechnology* **2**(3) :201-206 ,202p.
- [12] *Plantes aromatiques et médicinales du Haut Atlas Oriental , Petit catalogue à l'usage ,des guides de montagne,43p.*
- [14] Béjaoui, A., A. Boulila, et al. (2017). "Chemical composition and bioactivities of the polyphenolic-rich extract of *Ormenis africana* Jord. and Fourr." *International journal of food properties* **20**(8): 1786-1795, 1790p.
- [15] Cottiglia, F., L. Casu, et al. (2005). "Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis*." *Zeitschrift für Naturforschung C* **60**(1-2): 63-66, 63p.
- [16] Attia, S., K. Grissa-Lebdi, et al. (2015). "Persistence of Toxicity in Four Natural Extracts Controlling *Tetranychus urticae* as Affected by Tween® 20 Supply." *PESTICIDE SC.* 79. Effects of some insecticides on the viability and the ATP synthesis of honeybee drone's **10**(1) ,1p.
- [17] Attia, S., K. L. Grissa, et al. (2012). "Acaricidal activities of *Santolina africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*)." *Pest management science* **68**(7): 1069-1076, 1069p.
- [18] Lebbal, S., A. Lebbal, et al. (2018). " In vitro screening of insecticidal effect of plant aqueous extracts on the cowpea aphid *aphis craccivora* ." *Agrofor* **2**(2) ,75p.
- [19] Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique, Saint-Etienne.
- [20] Haas, D. (2015). Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens*: exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane, Paris 11.
- [21] Crozier, A., M. N. Clifford, et al. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*, John Wiley & Sons ,1p.
- [22] Seghiri, R. "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*."

- [23] P. Claude Spino, P. Jean Lessard, Notes de cours, Chimie des Substances Naturelles, Département de Chimie, Université de Sherbrooke 1995-2017, 10p.
- [24] Wilfred, V. and R. Nicholson (2006). Phenolic compound biochemistry, Springer, 2p.
- [25] Koné, D. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes: extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante, Metz.
- [26] Akroum, S. (2011). "Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels."
- [27] Arraki, K. (2014). Les stilbénoides chez les Cypéracées: isolation, identification et étude de leurs activités biologiques: identification et dosage des stilbènes dans des vins Tunisiens, Université de Bordeaux.
- [28] Wilfred, V. and R. Nicholson (2006). Phenolic compound biochemistry, Springer, 7p.
- [29] Tabart, J. (2011). Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire, Université de Liège, Liège, Belgique.
- [30] Pinheiro, P. F. and G. C. Justino (2012). Structural analysis of flavonoids and related compounds-a review of spectroscopic applications. Phytochemicals -a global perspective of their role in nutrition and health, In Tech, 34p.
- [31] Laid, Z. (2016). ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES EXTRAITS ORGANIQUES DES DIFFERENTES PARTIES DE LIMONASTRIUM Feei-Blombaginaceae-(Mlefet Khadem).
- [32] Isorez, G. (2007). Contribution à la chimie des flavonoïdes: Accès à des analogues de pigments du vins rouges, Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- [33] Lachat, L. (2011). Caractérisation des composés phénoliques présents dans deux espèces du genre Alchemilla, Haute Ecole d'Ingénierie.
- [34] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris, 575p.
- [35] Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.), Lavoisier, 375p.

- [40] Harborne, J. (1984). *Methods of plant analysis. Phytochemical methods*, Springer: 1-36 , (8 ,52 ,72) p.
- [41] Mekkiou, R. "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèces du genre *Genista* (Fabaceae)."
- [42] Carreau, J.-P. and J. Raulin (1964). "Séparation des isomères géométriques d'acides gras monoéthyléniques sur couche mince de talc. Dosage semi-quantitatif." *Journal of Chromatography A* **15**: 186-190 ,66p.
- [43] Harkati, B. "Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae."
- [44] Were, O. (1988). *Isolation and Chemical Characterization of Flavonoids from Tephrosia interrupta and Tephrosia linearis*, MSc thesis, University of Nairobi, Nairobi.
- [45] Harborne, J. B. and T. J. Mabry (2013). *The flavonoids: advances in research*, Springer ,20p.
- [46] Berreghioua, A. (2016). *Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud Algérien : Moricandia arvensis et Zilla macroptera*, 12/01/2016.
- [47] Anthoni, J. (2007). *Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes*, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- [48] Pessel, F. (2013). *Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels*, Paris 11.
- [49] Fawzia, B. (2015). *Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes Rumex vesicarius L. et Anvillea radiata Coss. & Dur*, Thèse De Doctorat de l'Université De Abou Bekr Belkaid, Telmcen: 144p.
- [50] Boubekri, C. (2014). *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques*, Université Mohamed Khider Biskra.

- [51] Kebieche, M. (2009). "Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L."
- [52] Boutaghane, N. (2013). "Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae)."
- [53] Bellahsene, C. (2017). Examen phytochimique et Pouvoir antimicrobien et anti-radicalaire des extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzia) de la région d'Aïn Sefra (Algérie), Université Abou Bekr Belkaid TLEMCEM.
- [54] SELLES, C. (2012). Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5 M.
- [55] N'Guessan, K., B. Kadja, et al. (2009). "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)." *Sciences & Nature* 6(1) :1-15,5p.
- [56] Boizot, N. and J.-P. Charpentier (2006). "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier." *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques: 79-82 ,80p .
- [57] HAMADA, D. (2017). Etude Structure Activité des Principes Actifs de la Plante *Anvillea radiata* Asteraceae.
- [58] Belguidoum, M., H. Dendougui, et al. (2015). "Antioxidant activities, phenolic, flavonoid and tannin contents of endemic *Zygophyllum Cornutum* Coss. From Algerian Sahara." *Der Pharma Chemica* 7: 312-317 ,313p.
- [59] Fadili, K., H. Zerkani, et al. "Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydant des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa* L " ,121p.
- [60] Singh, R. G., P. S. Negi, et al. (2013). "Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour." *Journal of functional foods* 5(4): 1883-1891 ,1885p.

- [61] BENHAMMOU, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.
- [62] Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit.(Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes, Université du Droit et de la Santé-Lille II.
- [63] Faustin, M. (2013). Étude de l'effet des alcaloïdes sur la corrosion de l'acier C38 en milieu acide chlorhydrique 1M: application à *Aspidosperma album* et *Geissospermum laeve* (Apocynacées), Antilles-Guyane.
- [64] Dunet, J. (2009). Réaction de Michael et de Mannich appliquées à des arylcyclohexa-2, 5-diènes en vue de la synthèse d'alcaloïdes de type *aspidosperma* et morphinanes, Bordeaux 1.
- [65] Amzazi, P. S., P. Y. BAKRI, et al. "Caractérisation phytochimique et propriétés antiproliférative, antibactérienne et antiparasitaire de seize plantes médicinales."
- [66] Benamar, M. (2009). "Etude de l'activité antimittotique et anticancéreuse des alcaloïdes naturels ou synthétiques d'*Arisarum vulgare* L. et de *Pancreas foetidum* Pom. Sur deux lignées cellulaires cancéreuses P815 et HEP."
- [67] Aliyu, A., M. Ibrahim, et al. (2012). "Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria." *Romanian Biotechnological Letters* **17**(4): 7458-7465.
- [68] Ferreira, E., C. Giacomelli, et al. (2004). "Evaluation of the inhibitor effect of L-ascorbic acid on the corrosion of mild steel." *Materials Chemistry and Physics* **83**(1): 129-134.
- [69] M'Hiri, N. (2015). Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone, Université de Lorraine.
- [70] Zhou, K. and L. Yu (2004). "Antioxidant properties of bran extracts from Tregg wheat grown at different locations." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(5): 1112-1117.
- [71] Prieto, P., M. Pineda, et al. (1999). "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum

complex: specific application to the determination of vitamin E." Analytical biochemistry **269**(2): 337-341, 339p.

- [72] Miguel, M. G., S. Nunes, et al. (2014). "Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal." Food Science and Technology (Campinas) **34**(1): 16-23,19p.
- [73] Djeridane, A., M. Yousfi, et al. (2007). "Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity." European Food Research and Technology **224**(6): 801-809,807p.
- [74] Ganapathi Sundaram, R. and M. Sundaravadivelu (2016). "Anticorrosion activity of 8-quinoline sulphonyl chloride on mild steel in 1 M HCl solution." Journal of Metallurgy **2016**.
- [75] Salah-Fatnassi, K. B. H., F. Hassayoun, et al. (2017). "Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia." Saudi journal of biological sciences **24**(4): 875-882, 8879p.
- [76] Constantin, F. (2011). Etude de l'efficacité d'inhibiteurs de corrosion utilisés dans les liquides de refroidissement, INSA de Lyon.

المراجع العربية:

- [13] "الحسن زعيتن , تحديد المكونات الأساسية لأطوار الكلوروفورم والزيوت الأساسية لأنواع من العائلة السيسنتية (Cistaceae) و (Compositae) المركبة .
- [36] ح , عمر , إيمان حسام محمد , التشخيص النوعي والطيفي والتقدير الكمي لبعض المكونات الفعالة لنبات الشنان من نوع *SeidlitziaRosmarinus* ودراسة فعاليتها ضد البكتيريا المرضية وإمكانية استخدامه في صناعة الصابون , مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة , المجلد السابع , العدد الثاني لسنة 2013.
- [37] "برحال جمعة , فصل منتجات الايض الثانوي الفلافونيدي لبعض نباتات العائلة الريزيدية , رسالة دكتوراه جامعة"
- [38] " , ميثاق , بحث وتحديد نواتج الايض الثانوي لنبات القات *Cathaedulis* من العائلة (Celastraceae) ونبات البوليكاريا (*Pulicariajaubertii*) من العائلة (Asteraceae) وتقييم الفعالية البيولوجية ص 44.
- [39] "أ , سعاد التنقيب عن الجزئيات الفعالة من النباتين الصحراويين : *Chrysanthemum fuscatum* و *Colocynthis vulgaris*

ودراسة الأثر الوقائي للنظام الهيبياتولوجي والهييماتولوجي لدى الجرذان المعاملة بمضادات السل".

**CE TRAVAIL A ÉTÉ INITIALEMENT APPROUVÉ PAR
L'INTERNATIONAL JOURNAL OF PUBLICATION DER
PHARMACIA LETTER DANS SON PROCHAIN
NUMÉRO CE MOIS-CI :**

**total flavonoids and total phenolic content, Antioxidant ,
Antibacterial and Corrosion Activities of of Plant Extracts of
*Santolina Africana Jord. et Four***

**Tarak Mekhelfi^{1,2} , Manel Zaoui-Djelloul Daouadji¹,Safa Benhamed¹ , Lahcene
Zaiter² ,Fatma TABAI¹**

¹Department of Chemistry Faculty of Mathematics & Matter Sciences
Kasdi Merbah University Route de Ghardaia, Ouargla, 30000 Algeria

²Unité de recherche Valorisation des Ressources Natu relles, Molécules Bioactives et
Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de
Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, Constantine, Algérie

Corresponding author: Mekhelfi .T, Department of Chemistry Faculty of
Mathematics & Matter Sciences Kasdi Merbah University Route de Ghardaia,
Ouargla, 30000 Algeria Tel. +213 790 570 555; E-mail: tarakmekhelfi@gmail.com

Abstract :

Santolina Africana Jord. Four is of the Asteraceae family, an endemic plant that grows in northeastern Algeria, which has great benefits in traditional medicine (used as antiperspirants, antiseptics, antiseptics, bactericidal and anti-diabetic). [1] The studies have demonstrated antioxidant activity and bacteria for volatile oils of this plant [2]. Firstly, Preliminary tests for chemical families have been shown presence of (flavonoids, tannins, coumarins, alkaloids, sugars). The content of phenols, flavonoids was estimated by spectrophotometric methods. Also The antioxidant activities of the extracts of *S.Africana* were investigated by DPPH test and phosphomolybdenum assay. The results of the quantitative estimation of total phenols by Folin-Ciocalteu reactif showed that the n-butanol phase had the highest ratio (123,3875(mg GAE /g)). The results of the quantitative evaluation of flavonoids by trichlorure d 'aluminum showed that the phase of the petroleum ether contained an excess of flavonoids in the unusual. results for the test anti-oxidant of

test the **DPPH** .The n-butanol phase showed the best result followed by the acetate phase (**IC₅₀** = 45.90 ±0.573 & 38.80 ± 1.201 **mM** respectively). The result of **TAC** test the n-butanol extract gave the highest inhibitory (**TAC** = **1.227±0.02**(mM))concentration followed by the petroleum ether ,acetate and , chloroform phase . Antibacterial activity was performed on two Gram negative strains (Escherichia coli ATCC25921 , Pseudomonas aeruginosa ATCC29733), and a third Gram-positive strain (Staphylococcus aureus ATCC25923). The phase gave the petroleum ether the highest inhibition (**CMI** =12 mm) against strain **Staphylococcus aureus**. Finally, the results anti-corrosive by Tafel method effect of the crude ethanol extract showed that the latter was effective a large percentage .

Keywords: *Santolina Africana Jord. Four* ,Preliminary tests , Phenol, Flavonoid, DPPH, Total antioxidant activity

INTRODUCTION :

The relationship between man and nature has existed for many centuries, and this correlation increases according to his requirements especially in the field of pharmacy, medicine and beauty.Traditional medicine has been widely known and widespread among our predecessors, especially in the countries of the African continent, including Algeria. *Santolina* species are a complex group of botanical species whose chemo-taxonomic classification is periodically revised. [3]is present in Algeria with 3 species: *Santolina africana Jord. et Four.* *S. lonadioides Coss.* *S. nobilis L. J. Gay.* [2] *Santolina* species are a rich source of essential oil and polyphenolic compounds. Where phenolic compounds are responsible on promoting the health properties of natural products. Soaking of the flower heads of this plant is used in traditional medicine against intestinal heaters, as an anti-spasmodic, anti-inflammatory, antiseptic, bactericidal and for different kinds of dermatitis [3],[4]. Inflorescences of this plant are mixed with honey and used for the treatment of cardialgia ulcer and stomach pain [5]. Her essential oils are against the two-spotted spidermite (Tetranychus urticae) [6].

Our goal in this study is to estimate the quantification, polyphenols and flavonoids by the **Folin-Ciocalcu** reagent and **aluminum trichloride** respectively in addition to

promoting this work by the study of biological effectiveness and effectiveness of the anticorrosion of the plant studied.

Harvesting of plant material:

Were collected in In May 2015 in the Biskra region (South-east of Algeria), It was dried under shade for several weeks and kept away from light and moisture.

Extraction method:

(227g) of the antenna part were macerated EtOH–H₂O (70:30, v/v) for 24-72 h tow times , the ethanol extract is then filtered and then dried in 35 ° C by the rotary evaporator, and then treated with distilled water , extraction by gradient in polarization of solvants (petroleum ether)<(CHCl₃)<(ACOET)<(n-butanol) .

The weights of the four phases obtained from the extraction steps after concentration are : **1.5318 g (Petroleum ether) , 1.268 g (Chcl₃), 1.1967 g (ACoET) , 1.5152 g (n-butanole).**

Preliminary tests to detect the chemical families in the ethanol extract [7]:

Alkaloids : Add Dragerouf Wagner Reagent Drops

Flavonoids : Add concentrated Hcl + Mg chip

Tannins : Add Fecl₃ 1%

Sugars : Add Fehling's reagent (A + B)

Saponines : Agitation vigorously

Terpenes : Add CH₃cl + H₂SO₄

Coumarins : Add NH₄OH 10%

Total phenolic content :

The total phenolic content in the extracts of *S.Africana* was estimated by using Folin-Ciocalteu reagent. A volume of 100 μ l of the extract solutions at different concentrations are added to 1.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (10%). After 5 min, 1.5 ml of sodium carbonate (6%) are added. The mixture is allowed to react for 90 minutes at room temperature and then the reading is made at 725 nm. Gallic acid (0.03 -0.3 mg / ml) is the standard used to establish the calibration curve, from which the concentration of the total polyphenols in the extracts is calculated. The result is expressed in mg equivalents of gallic acid per gram of extract (**mg/ g**). [8]

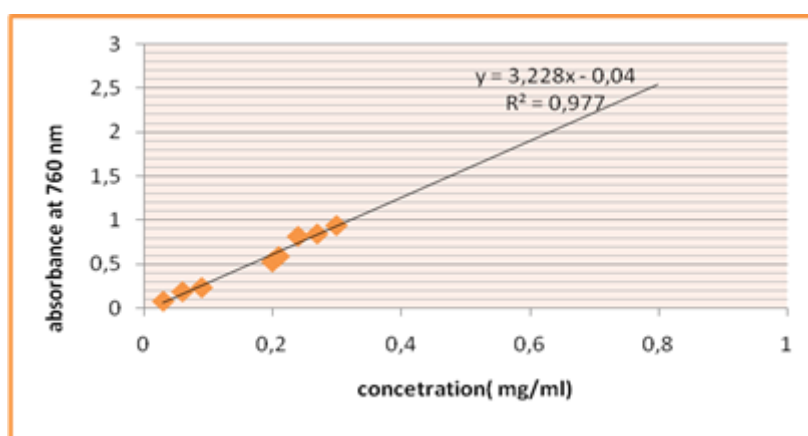


Figure : The standard curve of gallic acid

Total flavonoid content :

Total flavonoid content in crude extract and *S.Africana* fractions was estimated using the aluminum chloride method. 0.5 ml of a 2% ethanol $AlCl_3$ solution was added to 0.5 ml of extract. After 30 min of incubation at ambient temperature, the absorbance was measured at 430 nm and the results were expressed in mg of quercetin equivalent per gram of dry weight of plant (mg EQ/g). [9]

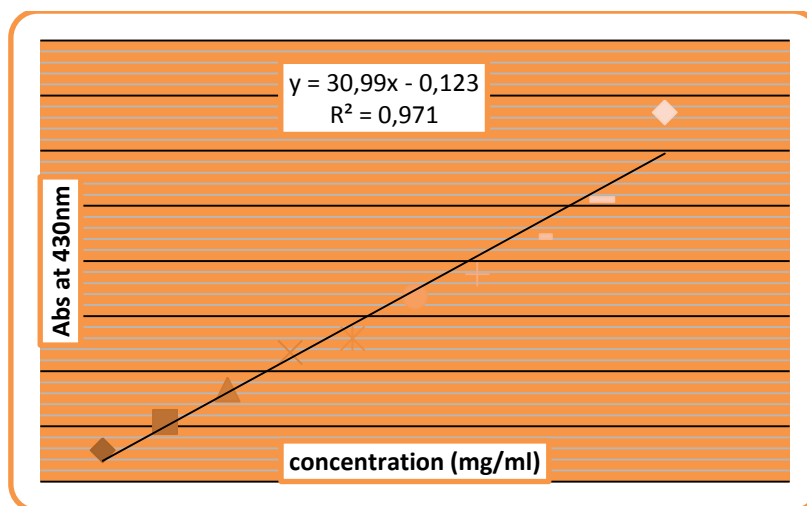


Figure : The standard curve of quercetin

Determination of antioxidant activity :

The free radical scavenging activity of *S.Africana* extracts was measured in terms of hydrogen donation or radical scavenging ability using the stable free radical DPPH according to the method *Zhou and Yu (2004)*. [22] Different concentrations of the extract were added to 3.0 ml of 0.1 mM DPPH solution in ethanol. After vigorous mixing the tubes were incubated in the dark. After 30 minutes, the absorbance was read at 517 nm. The IC₅₀ value (the concentration required to trap 50% of free radicals of **DPPH**) was calculated from the curve of concentration versus trapping activity. Ascorbic acid has been used as a positive control [10]. The ability to trap the DPPH radical was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

Where **A₀** is the absorbance of the control reaction and **A₁** is the absorbance in the presence of the sample. The 50% inhibitory concentration of the DPPH (IC₅₀) root activity is calculated for each extract of the inhibition curve (% I) against the concentration of extracts.

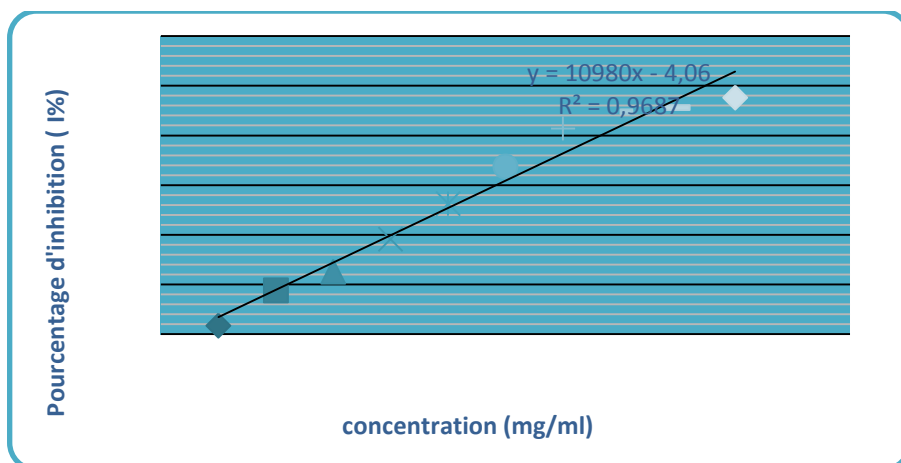


Figure : The standard curve of ascorbic acid

Determination of total antioxidant activity:

The total antioxidant capacity (TAC) of the extracts is evaluated by the method of phosphomolybdenum from (Prieto *et al* 1999) [23] . A volume of 0.3 ml of each ethanolic extract is mixed with 3 ml of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes are screwed and incubated at 95 ° C for 90 min. After cooling, the absorbance of the solutions is measured at 695 nm against the white which contains 3 ml of the reagent solution and 0.3 ml of ethanol and is incubated under the same conditions as the sample. The total antioxidant capacity were expressed as mM equivalent ascorbic acid.) . [11]

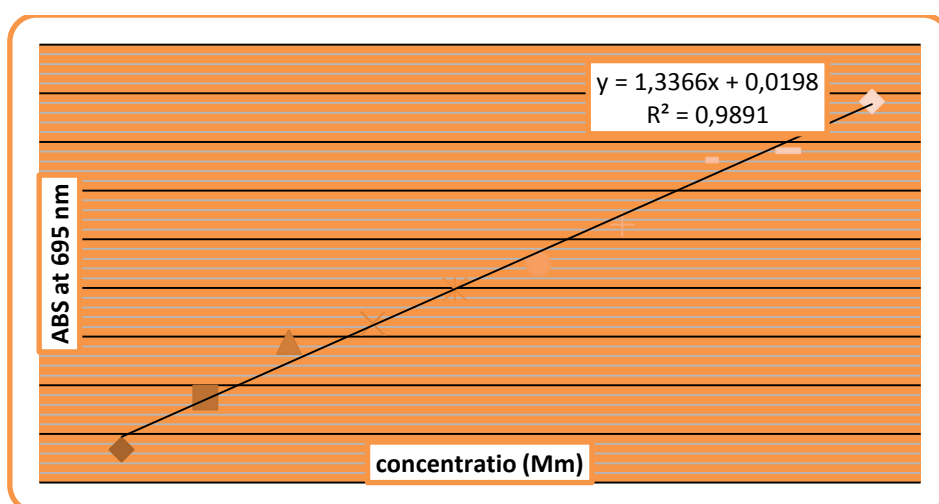


Figure : The standard curve of ascorbic acid

Antibacterial activity:

Antibacterial studies have been evaluated by method of discs-diffusion [12]

Bacterial strains:

Three references bacterial strains were obtained from the Pasteur laboratory in Algeria two Gram negative strains (*Escherichia coli ATCC25921* , *Pseudomonas aeruginosa ATCC29733*), and a third Gram-positive strain (*Staphylococcus aureus ATCC25923*) .

Preparation of extracts:

melted 0.1 g of each extract in 1 ml of **DMSO**, and then diluted each with specific concentrations.

Sterilization:

Before starting work, the work surface was cleaned with bleach water, the work is near a benzene beak. We have prepared **whatman 3** paper diameter 6mm discs which has good absorption of extracts , the (a forceps + these discs) are sterilized at 120 ° for 20 min in autoclave.

Antibiograms:

Seeding:

Bacteria are removed with a sterile swab of physiological saline, spread over the surface of the medium zigzag, taking care to cover the entire surface with bacterial colonies.

Place disks and incubation:

Each batch of disks is dipped into the extracts The disks so drenched are dried in room temperature, by a sterile forceps are deposited in petri dishes and close them. The Petri dishes are finally placed in a 24-hour incubator at 37 ° C.

Read the results:

The larger the zone of inhibition, the greater is the sensitivity of the bacterial strain tested vis-à-vis the extract studied. Each zone can be measured by various means: ruler, compass, vernier caliper. The circular inhibition zone is measured by the diameter in mm, then it will be possible to calculate the **MIC** of the extract for the strain examined. Inhibition concentration (**MIC**) is defined as the lowest concentration of the extract to inhibit the growth of microorganism and was determined on the basis of micro-well dilution method [13] .

MIC: is the lowest concentration that completely inhibits growth of the organism in the tubes as detected by the unaided eye. The MIC were determined by macrodilution broth method (**Wikler, 2009**) .[14]

The study of anticorrosion activity:

The Tafel method (polarization curves):

Preparation of sample:

The sample to be studied is cylindrical, (1.6 cm × 0.75 cm) XC52 steel. This sample is scraped before each experiment by glass paper degraded (400,600,800,1000,1200,1500,2000).

Used equipment and tools:

- * Potentiostat **PGZ 301** connected to a computer with software (Volta master 4)
- * Electrochemical cell of the glass **Pyrex** double-wall thermostatic capacity of **500ml**, provided with three slots allow the insertion of electrodes.

*** Electrodes:**

Working electrode (**ET**): is X52 steel. Auxiliary electrode (**CE**): Is a platinum cylinder polished 1cm² surface, its role is to ensure the passage of electric current in the electrochemical cell and the reference electrode (**ER**): which is a saturated

calomel electrode noted ECS in potassium chloride (KCl), constituted by the Hg₂ / Hg system; Cl / KCl;[15]

Preparation of solutions:

A. Corrosive medium: the study medium chosen is (HCl 1M)

B. Inhibitory solutions: The various concentrations of inhibitor which represents the crude ethanol extract (1–25 ppm) ,solution and without the presence of inhibitor solution (1 M HCl) are taken as blank for comparison.

The Tafel curves were obtained by changing the electrode potential automatically from –300 to +300 mV versus the open circuit potential at a scan rate of 0.2 mV/s.

The corrosion yield as well as the surface coverage density was calculated from the two relationships [16] :

$$R \% = \frac{i_{corr} - I_{corr}}{i_{corr}} , \quad \theta = R / 100$$

i-corr: Corrosion current in the absence of inhibitor.

I_corr: Corrosion current in the presence of inhibitor.

R%: Inhibition yield.

θ: Surface coverage ratio.

E: potential.

The plot of the intensity-potential curves allows the determination of the potential of corrosion (E_{corr}), the polarization resistance (RP), the corrosion current density (I_{corr}), the cathodic (bc) and anodic (ba) slopes of Tafel and consequently the rate of inhibition under the operating conditions used.[20]

RESULTS AND DISCUSSION :

Preliminary data showed the presence of most chemical families in the crude ethanol extract, indicating that the plant being studied is rich in secondary metabolites, particularly tannins, comarines and terpenes, giving a rather distinct color dark.

Extraction yield, total phenolic, flavonoid , DPPH scavenging, and total antioxidant activity :

The yield of the extraction : The yield of the extraction of the petroleum ether extract and the butanol very close and they were the highest yield(0.4684 % & 0.4633 % respectively) , while the acetate and chloroform were the least yielding 0.3877% & 0.3659% respectively) . In general, the yield is somewhat weak, which explains the plant's poverty quantitatively rather than qualitatively.

total phenolic of *S.Africana* extracts expressed as gallic acid equivalent per gram dry weight (mg GAE/g DW), ranged from The highest content was found in n-butanol and ACoET, the lowest content was registered in Petroleum ether and Chloroform of the crude extract of *S.Africana*.

Total flavonoid of the extracts, of *S.Africana* expressed as quercetin equivalent per gram dry weight ($\mu\text{g QE/g DW}$), . The highest amounts of flavonoids were present in the Petroleum ether and n-butanol extract, while the lowest were recorded in the acetate and chloroform extract .Polyphenols were generally found in the phases of polarity solvents such as acetate and butanol, which are interpreted as melting in these phases better than other non-polar or low-polar phases .

The results of the antioxidant effect of the DPPH-test showed that the highest value of IC₅₀ was for the n-butanolic phase followed by the acetate phase, then the petroleum ether phase and then the chloroform phase. **IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) =**

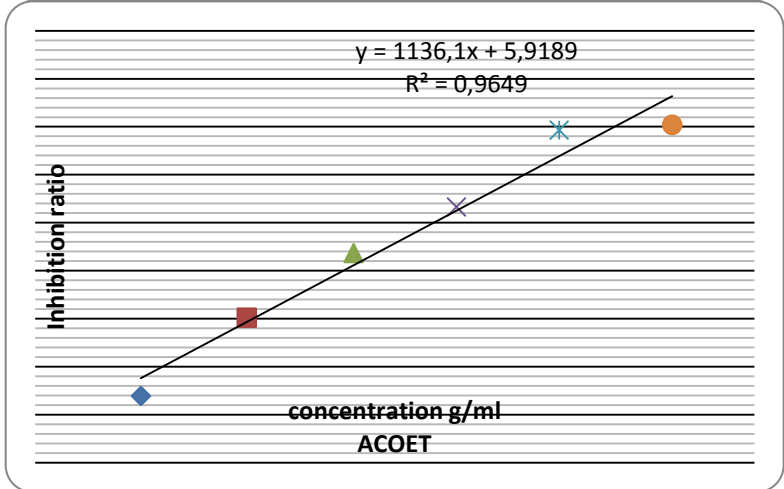
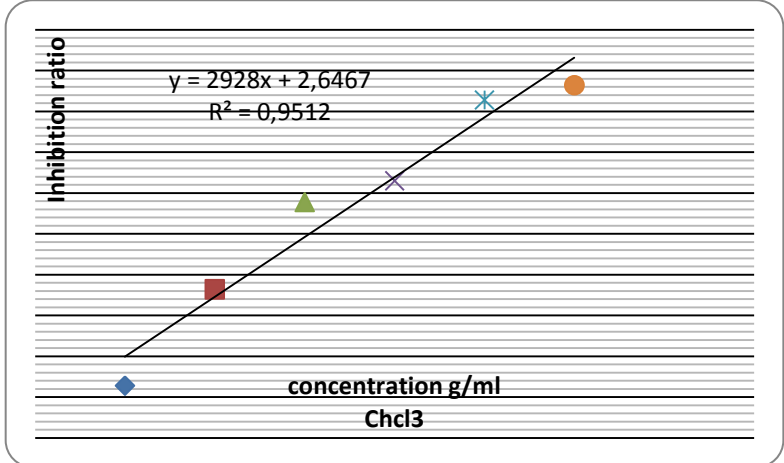
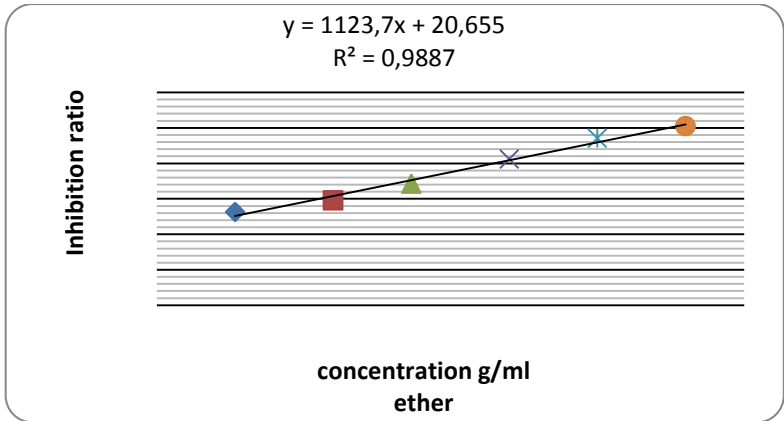
ascorbic acid 49.23 ± 0.02 > n-but 45.90 ± 0.573 > AcOET 38.80 ± 1.201 > 26.13 ± 3.112 Petroleum ether > Chloroform 16.17 ± 2.13 ($\mu\text{g/ml}$) These results correspond to the quantitative estimate of the presence of high phenols in the same phases which show high effectiveness against the free radicals. We know that many phenols are responsible for clearing free radicals , the rate of inhibition of the phase of the butanol is close to the inhibition ratio of the reference ascorbic acid and this explains why this phase contains donor groups of hydrogen atoms .[17]

Total antioxidant activity TAC Expressed as absorbance in terms of the inverse of dilution factor. was recorded the highest in n- butanol extract , acetate and petroleum ether extract ,the lowest antioxidant activity was recorded in the chloroform extract , These results are also consistent with the results of the quantitative estimation of

polyphénols ,It is also related to the results of the quantitative estimation of flavonoids where the n-betanol phase contains the second highest flavonoids after the phase of petroleum ether, this disparity in the rates of inhibition suggests that polar phases are always more likely to contain the particles that give the electrons than their non-polar counterparts .

/	Yield %	total phenolic (mg GAE/g)	Total flavonoid (mgQE/g)	DPPH IC50 (µg/ml)	TAC (mM)
Petroleum ether	0.4684 ± 1.425	6,2855 ±0.02	25,61 ±0.858	26.13 ±3.112	1.160± 1.3
Chloroform	0.3877 ± 0.01	5,3651 ±0.6	6,3 ±0.06	16.17 ±2.13	1.045± 0.33
AcOET	0.3659 ± 2.7	43,6454 ±0.2	1,71 ± 1.32	38.80 ± 1.201	1.130±0.7
n-but	0.4633 ± 3.1	123,3875 ±0.01	9,97 ±0.573	45.90 ±0.573	1.227±0.02
Acide ascorbique	-	-	-	49.23 ± 0.02	-

Table : result of total phenolic, flavonoid , DPPH scavenging, and total antioxidant activity result .



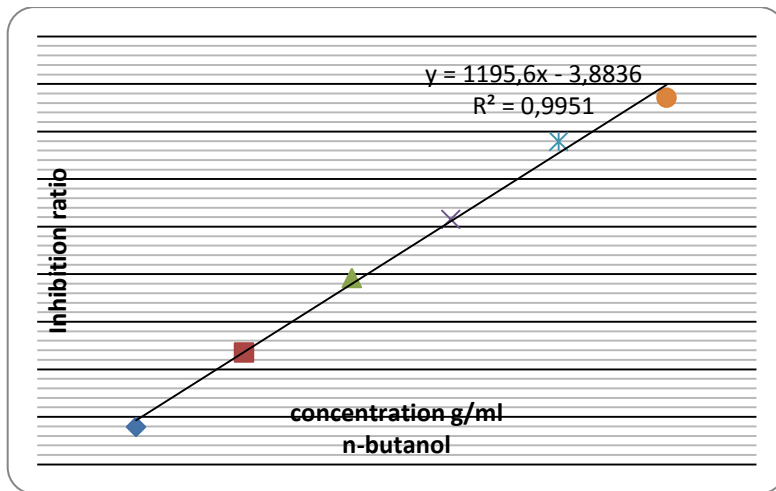
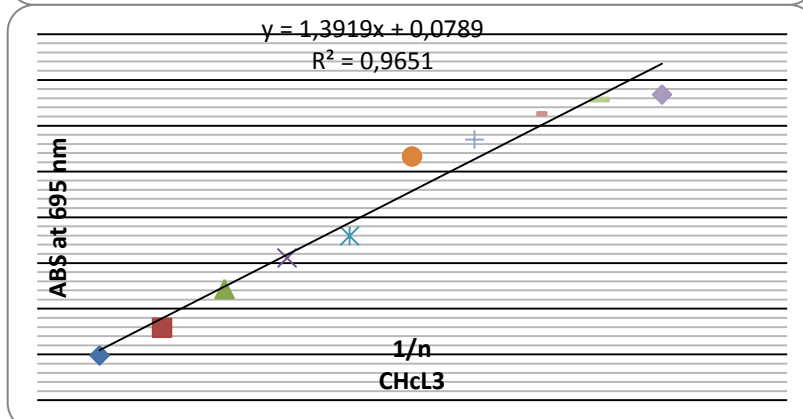
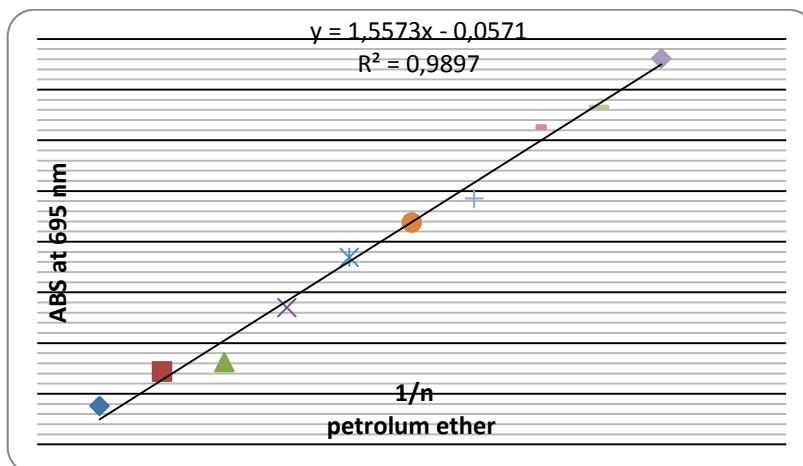


Figure : the inhibitory ratios curves (IC₅₀) of Santolina plant extracts

Note through the curves results, the results clearly show that there is a positive relationship between the content of phenolic compounds and plant extracts And reticular effect on the **DPPH** root, in agreement with the results of many researchers The mechanism of interaction between the antioxidant compounds and the **DPPH** root is its chemical structure as well as the number of hydroxyl groups it contains [21].



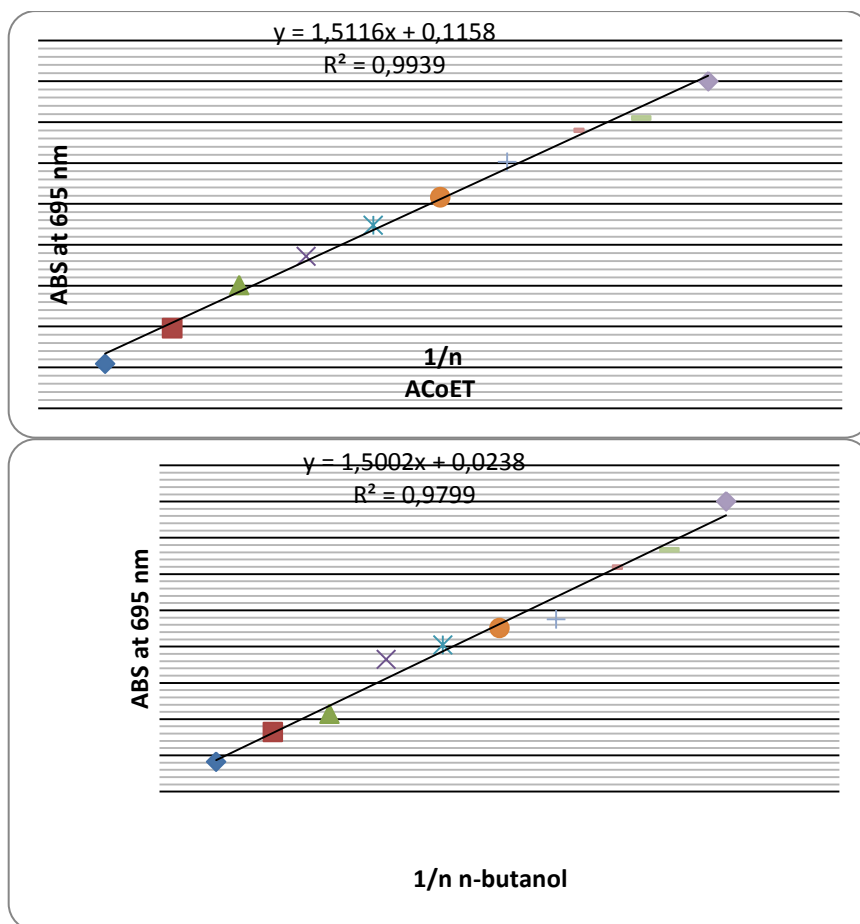


Figure: he curves of the total antioxidant capacity of *S.AFRICANA* extracts

Résults of Anti bacterial activity:

Inhibitor diameter (mm)			Concentration (mg/ml)	
Escherichia coli ATCC25921	Staphylococcus aureus ATCC25923	Pseudomonas aeruginosa ATCC29733		
-	4.5	-	A= 100	Raw extract
-	0.3	-	B=50	
-	-	-	C=25	
-	4	-	A=100	Aqueous extract
-	7	-	B=50	
-	5	-	C=25	
-	12	-	A=100	Petroleum ether extract
-	9	-	B=50	
-	9	-	C=25	
-	-	-	A=100	Chloroform extract
-	-	-	B=50	
-	-	-	C=25	
-	-	-	A=100	AcoEt extract
-	7	-	B=50	
-	9	-	C=25	
-	10	-	A=100	n-butanol extract
-	-	-	B=50	

-	-	-	C=25	
---	---	---	------	--

The results showed that the extract of petroleum ether gave the highest diameter inhibition between all extracts as much as (12 mm) at a concentration of 100 mg/ml against *Staphylococcus aureus ATCC25923* bacteria followed by the extract of the water-based betanolic extract and then the acetate extract and then the water extract and the crude ethanol. As for the remaining two species, no extract from the extracts gave any resistance against these colonists (*Escherichia coli ATCC25921* , *Pseudomonas aeruginosa*).

Corrosion inhibitory activity:

Note that after the addition of the extract, the rate of corrosion decreases in the acid medium, accompanied by an increase in the corrosion yield R%, The decrease of current density is due to the adsorption of inhibitor molecules on mild steel surface to retard the corrosion reaction of electrode From this study we observed that, on increasing the inhibitor concentration (1– 25 ppm) .

Concentration of extract (ppm)	E(i=0)mv	Rp (ohm.cm)	i(corr) (mA/cm ²)	Ba (mA)	Bc (mA)	V-corr(uA/γ)	R %	Θ
0	-546,2	104,29	0,9726	186,5	167,9	2,019	0	0
1 (C)	-529,9	86,75	0,7323	163,7	155,2	8,565	24,7069	0,247069
2.5 (D)	-534,7	101,51	0,6177	160,2	157,8	7,224	36,4898	0,364898
5 (E)	-534,6	91,28	0,553	162,6	196,3	6,468	43,142	0,43142
10 (F)	-537,6	98,23	0,5125	144,3	184,8	5,994	47,3061	0,473061
15 (G)	-524,6	91,26	0,4919	132,1	184,1	5,753	49,4242	0,494242
20 (H)	-512,2	91,3	0,3938	116,8	165,4	4,606	59,5105	0,595105
25 (I)	-481,5	132,91	0,3231	155	195,2	3,779	66,7797	0,667797

Table : Effectiveness values of anti - corrosion and surface density

The results of the table are translated into the following curves :

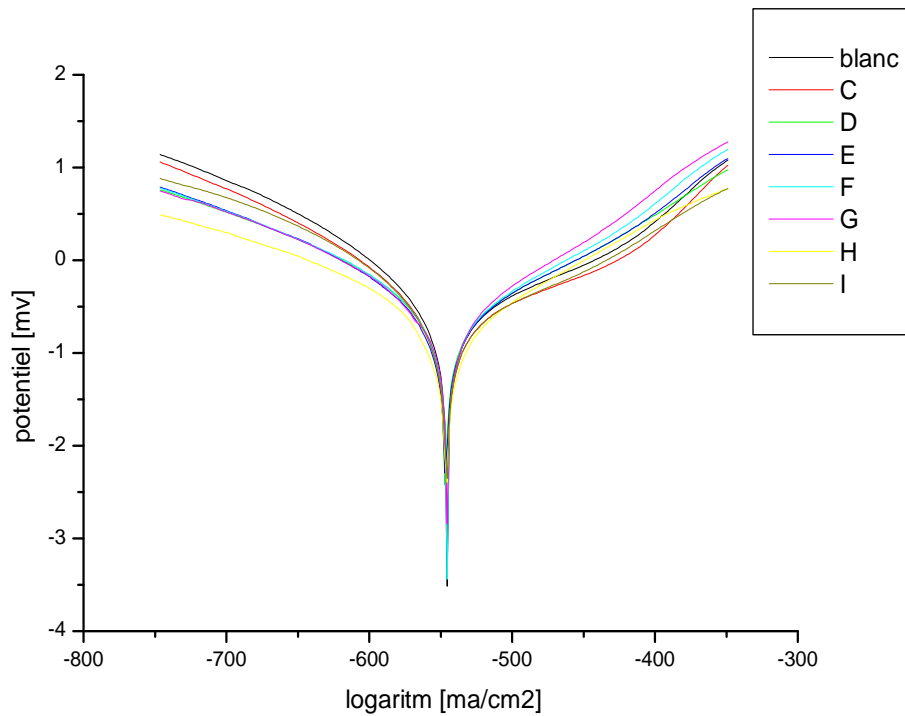


Figure: Polarization curves of X52 steel with and without addition of the extract of the *S.Africana* in HCl at room temperature .

According to *Ferreira and others* [24] , if the displacement of corrosion potential (E_{corr}) is greater than 85 mV with respect to the corrosion potential (E_{corr}) of the blank solution, the inhibitor can be seen as a cathodic or anodic type. In this study, the maximum displacement was 65.2 mV anodically with respect to the blank. This indicates that the studied inhibitor behaves predominantly as anodic type .[18] Our inhibitor reduces the anodic dissolution of steel (described by the reaction) ($\text{Fe} \leftrightarrow \text{Fe}^{+2} + 2\text{e}^-$) and delays the evolution of the cathodic discharge of protons $\text{H} + (2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2)$.

The mechanism of this inhibition is made by forming a layer of the of the extract on the alloy steel, which is where prevent iron oxidation in middle of Hcl .

We can also say that this inhibitory force is due in part to the antioxidant activity of the flavonoids present in our synthesis according to one study .[19]

CONCLUSION:

In general, the plant of **Santolina Africana** is rich in secondary metabolites, especially phenols and flavonoids, which shows the effectiveness of resistance to free radicals as well as its resistance to the bacterium **Staphylococcus aureus ATCC25923**, as well as its anti-corrosion effect. The results obtained for the first time at the level of the extracts of Santolina Africana, according to our bibliographic research, as it was preceded by the level of volatile oils, promote the therapeutic benefits in traditional medicine for this type waiting for further studies in this plant *Santolina Africana joudr &four*.

REFERENCES :

- [1] L. Zaiter, F.Benayache, N.Beghidja, G.Figueroa, P. Chalard, J.Chalchat, S. Benayache, *Journal of Essential Oil Bearing Plants.*, 18:6, 1338-1342.
- [2] k. Derouiche, A. Zellagui, N. Gherraf, A. Bousetla, L. Dehimat, S.Rhouati, *Research Article .J.B.Biosci.biotech.*,2013,2(3): 201-206.
- [3] I.Lmachraa, R.Fdil, N.Fdil, A.Mouzdahir, *J.Mater. Environ. Sci.*,2014. 5 (1) 67-72.
- [4] Aït Youssef, M. Plantes médicinales de Kabylie. Paris, France (2006).
- [5] A. Béjaoui, A. Boulila, I. Mahouachi, M.Boussaid, *International Journal of Advanced Research* .,2013, 1(9), 124-131.
- [6] S. Attia, a Kaouthar L Grissa, b Anne CMailleux, a S. Heuskin, G. Lognaye and T. Hancea, *Society of Chemical Industry*, (wileyonlinelibrary.com) D10.1002/ps.3269.
- [7] k. N'Guessan, K. Beugre, N.Zirihi, D. TRAORE & L. AKE-assi, *Journal de Sciences & nature.*, 2009, 6(1) :1-15.
- [8] D. HAMADA, Etude Structure Activité des Principes Actifs de la Plante Anvilla radiata Asteraceae, thèse de DOCTORAT, Université Kasdi-Merbah, Ouargla Faculté des sciences appliquées.
- [9] M. Belguidoum, H. Dendougui, Z. Kendour, A. Belfar, C. Bensaci and M. Hadjadj. *Journal of Der Pharma Chemica.*, 2015, 7(11):312-317.
- [10] R.S.Govardhan Singh, Pradeep S.Negi, C. Radha *journal of functional food*. 2013. 5.I883-I 89 –I.
- [11] M^{me} BENHAMMOU NABILA, Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, thèse de

DOCTORAT en biologie , Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers ,Université Abou Beker Belkaid, Tlemcen.

[12] K.B.H. Salah-Fatnassi, F. Hassayoun, I. Cheraif, S. Khan, H.B. Jannet, M. Hammami, M. Aouni, F. Harzallah-Skhiri, Chemical composition antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia, *Saudi Journal of Biological Sciences* (2016).

[13] ANEB M'hammed , Caractérisation phytochimiques et propriété antiproliférative antibactérienne et antiparasitaire de size plante Médicinales ,Université Mohamed V, Faculté des Sciences Rabat.

[14] X. Chen, C. Wang, G. Onivogui and Y. Song ., *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* . 2015, 11 (1): 11-16.

[15] Florina constantina , Etude de l'efficacité d'inhibiteurs de corrosion utilisés dans les liquides de refroidissement , UNIVERSITE DE PITESTI-ROMANIE , INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APLIQUEES DE LYON-France .

[16] Milcard FAUSTIN, Etude de l'effet des alcaloïdes sur la corrosion de l'acier C38 en milieu acide chlorhydrique 1M (Application à *Aspidosperma album* et *Geissospermum laeve* (Apocynacées)) , Université des Antilles et de la Guyane Institut de l'Enseignement Supérieur de la Guyane.

[17] Maria Graça MIGUEL*, Susana NUNES, Susana Anahi DANDLEN, Ana Maria CAVACO, Maria Dulce ANTUNES, Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal, *Food Science and Technol* , Campinas, 34(1): 16-23, Jan.-Mar. 2014.

[18] R. Ganapathi Sundaram and M. Sundaravadivelu, , *Journal of Metallurgy* 2016, Article ID 8095206, 9 pages.

[19] M'HIRI Nouha , Etude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydant des extraits des écore de l'organe (Maltaise demi Sanguine) et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier du carbone , Université Loraine Ecole Nationale supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires .

[20] SELLES Chaouki ; Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M . THESE de Docteur es sciences physiques ; REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE ,Ministere de l'enseignement superieur et de la recherche scientifique UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID.TLEMCEN.

- [21] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, JF., Stocker, P. ity. *European Food Research and Technology*. 2007. 224, 801-809.
- [22] KEQUAN ZHOU AND LIANGLI (LUCY) YU* ; Antioxidant Properties of Bran Extracts from Trego Wheat Grown at Different Locations ; *Journal . Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1112–1117.
- [23] Pilar Prieto, Manuel Pineda, and Miguel Aguilar .Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1 ; *Analytical Biochemistry* 269, 337–341 (1999) .
- [24] E.S. Ferreira, C. Giacomelli, F.C. Giacomelli, A. Spinelli . Evaluation of the inhibitor effect of l-ascorbic acid on the corrosion of mild steel ; *J. Materials Chemistry and Physics* 83 (2004) 129–134.

CET TRAVAILLE ÉTÉ LA PARTAGER DANS UN COMMUNICATIONS INTERNATIONALES :

L.R. Bioressources : Biologie Intégrative & Valorisation
& L'Association Tunisienne de Valorisation des Bioressources

BIOIVAL

BIOLOGIE
INTEGRATIVE & VALORISATION

ATVAB

Association Tunisienne de Valorisation
des Bioressources

ATTESTATION

Le comité d'organisation atteste par la présente que

Tarak MEKHELFI, Safa BENHAMED, Lahecene ZAITER, Fatma TABAI

A présenté la communication affichée intitulée :

**Investigation phytochimique de et activité biologique d'une plante
médicinale de la famille Asteraceae.**

**Lors des 9^{es} Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation
des Bioressources du 3au 6 mai 2018 à l'Hôtel SENTIDO Rosa Beach à
Monastir, Tunisie.**

Pour le comité d'organisation
Le professeur Lotfi ACHOUR


Signature

المخلص :

الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتنقية والتحديد البنوي للأبيض الثانوي لنبات *S. africana* (Jord and Fourr.) بالإضافة إلى الدراسات الثانوية، حيث أظهرت نتائج الاختبارات الأولية للكشف عن للعائلات الكيميائية وجود كلا من ((الفلافونويد ، التانينات ، الكومارين ، القلويدات والسكريات). تم تنفيذ عملية الفصل باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، حيث تمكنا من فصل منتج وحيد نقي من طور الكلوروفورم و خلاص الايثيل . بالنسبة للتقدير الكمي ، احتوى طور البيتا نول النظامي على أكبر كمية من عديدات الفينول ، في حين احتوى طور الأثير البترولي على أكبر كمية من مركبات الفلا ونويد . اما عن اختبار الفعالية مضادات الأكسدة لكسح الجذور الحرة فقد أعطى طور الكلوروفورم اقل تركيز مثبط قدر ب($IC_{50} = 0.01617 \text{ (mg / ml)}$) في حين أعطى طور البوتانول النظامي أكبر مقاومة في اختبار الفعالية المضادة للأكسدة الكلية، بالنسبة للدراسة المضادة للبكتيريا فان طور الايثر البترولي اعطى اكبر منطقة تثبيط ضد البكتيريا (*Staphylococcus aureus*) . اظهرت دراسة الفعالية المضادة للتآكل ان المستخلص الايثانولي الخام لنبات *S. africana* له فعالية مقاومة للتآكل .

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة ، بوليفينول ، فلافونويدات ، ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، *S. africana* ، (Jord and Fourr.) .

Résumé :

L'objectif de cette étude est d'isoler et de purifier la structure et la détermination du métabolisme secondaire de la plante *S. africana* (Jord et Fourr.) en plus des études secondaires où il a montré les résultats des tests préliminaires des familles chimiques ayant à la fois ((flavonoïdes, tanins, coumarines, alcaloïdes, sucres)). Le processus de séparation a été réalisé en utilisant la méthode CCM, où nous avons été en mesure de séparer une seule produit pur de phase chloroformique et acétate. En ce qui concerne l'estimation quantitative , de la phase n-butanol contenait la plus grande quantité de polyphénols, tandis que la phase d'éther de pétrole contenait la plus grande quantité de flavonoïdes. L'efficacité antioxydant des radicaux libres DPPH, le phase chloroformique a donné une concentration inférieure inhibitrice de ($IC_{50} = 0.01617 \text{ (mg/ml)}$), tandis que La phase butanolique a donné la plus grande résistance à le test TAC. L'étude de anti-bactérien a donné la plus grande zone d'inhibition contre les bactéries par la phase ether de pétrole contre (*Staphylococcus aureus*) . l'étude montraient anticorrosion que l'extrait brut de la plante *S. africana* a la capacité de réduire la corrosion des métaux en milieu acide .

Mots-clés: Activité antioxydant , chromatographie de couche mince, Flavonoïde ,polyphénols , , *Santolina africana* (Jord et Fourr.) .

Abstract :

The objective of this study is to isolate and purify the structure and determination of secondary metabolism of the *S. africana plant* (Jord and Fourr.) In addition to secondary studies where it has shown the results of preliminary tests of chemical families. having both ((flavonoids, tannins, coumarins, alkaloids, sugars)). The separation process was carried out using the CCM method, where we were able to separate a single pure product of chloroform phase and acetate. For the quantitative estimation, the n-butanol phase contained the largest amount of polyphenols, while the petroleum ether phase contained the largest amount of flavonoids. The antioxidant efficacy of the free radicals DPPH, the chloroform phase gave a lower inhibitory concentration of ($IC_{50} = 0.01617 \text{ (mg / ml)}$), while the butanolic phase gave the highest resistance to the TAC test. -bacterial gave the largest zone of inhibition against bacteria by the petroleum ether phase against (*Staphylococcus aureus*) . The study showed anticorrosion that the crude extract of the plant *S. africana* has the ability to reduce corrosion of metals in acidic medium.

Keywords: antioxidant activity, Flavonoid, polyphenols, thin-layer chromatography, *Santolina africana* (Jord and Fourr.).