

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA  
Faculté des sciences et de la technologie  
et sciences de la matière



Département des sciences de la matière

THESE  
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT  
EN CHIMIE

Option : Chimie Organique

par

M<sup>elle</sup> RAHMANI SMAHIA

**Recherche des substances bioactives de la partie  
aérienne de la plante *Limoniastrum feei***

**Jury de thèse :**

<b>M<sup>r</sup> SAIDI MOKHTAR</b>	Professeur à l'université d'Ouargla	Président
<b>M<sup>r</sup> HADJ MAHAMMED MAHFOUDH</b>	Professeur à l'université d'Ouargla	Examineur
<b>M<sup>r</sup> DENDOUGUI HOCINE</b>	Professeur à l'université d'Ouargla	Examineur
<b>M<sup>r</sup> BENKHALED MOHAMED</b>	Professeur à l'université Batna	Examineur
<b>M<sup>r</sup> CHERITI ABDELKRIM</b>	Professeur à l'université de Béchar	Examineur
<b>M<sup>r</sup> BELBOUKHARI NASSER</b>	Professeur à l'université de Béchar	rapporteur

Année universitaire : 2016 /2017

# إهداء

أهدي هذا العمل المتواضع :

إلى روح أبي الراحل الذي علمني كيف امسك بالقلم و كيف اخط الكلمات بلا ندم

إلى أمي الغالية التي زودتني بالحنان والمحبة

إلى إخوتي وأخواتي الأعزاء

## Remerciements



out d'abord je remercie le Dieu tout puissant pour m'avoir donné, le pouvoir, la force et la volonté pour réaliser ce travail.

J'adresse mes gratitudee à ma famille et spécialement mes parents dont l'affection et le soutien constant qu'ils m'ont portés ont été déterminants dans la réussite de mon parcours universitaire.

Je tiens tout d'abords à remercier **Mr. BELBOUKHARI NASSER.**, Professeur à l'université de Béchar et directeur du Laboratoire des molécules bioactives et séparation chirale, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, Je suis reconnaissante pour la confiance et le soutien

Mon travail de thèse s'est déroulé au sein de laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique (LPSO) à l'Université de Béchar sous les orientations et bienveillantes de son directeur Monsieur le Professeur **CHERITI ABDELKRIM.**, je ne saurai lui exprimer assez et fidèlement toute ma reconnaissance pour ses encouragements soutenus et je le remercie vivement pour cette marque d'intérêt et notamment de me faire bénéficier de leur expertise en acceptant de juger ce travail et de consacrer du temps à l'examen de ce manuscrit.

J'adresse mes chaleureux remerciements à **Mr SAIDI MOKHTAR.**, Professeur à l'Université d'Ouargla, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à **Mr.HADJ MAHAMMED MAHFOUD** , Professeur à l'Université d'Ouargla, pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail .

Mes vifs remerciements vont également à **Mr. DENDOUGUI HOCINE** , Professeur à l'Université d'Ouargla pour l'honneur qu'il me fait d'examiner ce travail.

Je suis également très honoré que **Mr. BENKHALED MOHAMED** , Professeur à l'Université de Batna pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance.

Je tiens également à remercier vivement **Mme KAID SLIMANE F**, médecin à l'hôpital militaire de Béchar et **Mr MOUSSAOUI** Médecin à l'hôpital Bechar jedide de Béchar, pour ses aides scientifique et techniques durant la réalisation de ce travail .

Je tiens à exprimer également à **Mr. AKERMI M.M**, ex-chef du laboratoire régionale de contrôle de la qualité et répression des fraudes, pour sa disponibilité, ainsi que pour son aide technique si précieux.

J'exprimé également mes sincères remerciements à Melle **BOUBEKERI N.**, pour leur aide ,disponibilité ; J'ai pu constamment bénéficier de ces encouragements.

Il est évident de remercier **Mr HABBAB A.**, doctorant en chimie qui a toujours répondu présente, sa gentillesse et ses grandes qualité scientifiques et humaines ont constitué un support permanent à ma réflexion. J'ai été heureuse de sa collaboration.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à Madame **BENAICHATA M.**, Maître Assistant à l'Université de Béchar ; J'ai pu constamment bénéficier de ces suggestions et de ses encouragements.

Mes vifs remerciements à l'administratrice du LPSO, **BOUZIANI ZOHRA** . Pour son aide technique si précieuse pour la réalisation de ce travail.

Je tiens, enfin, à remercier du fond du cœur ma famille et spécialement mes parents dont l'affection et le soutien constant qu'ils m'ont portés ont été déterminants dans la réussite de mon parcours universitaire.

## ملخص

الدراسات التي قمنا بها تتمثل في تحديد مركبات متعددة الفينول التي يحتوي عليها النوع *Limoniastrum feei*. لقد تمت عملية العزل وتقنية المركبات، استنادا إلى استخدام مجموعة من الاساليب الكروماتوغرافية، ولقد تم تحديد البنية الكيميائية لهذه المركبات باستخدام التقنيات الفيزيوكيميائية وتقنية التحليل الطيفي، مثل التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية، والتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء، والتحليل الطيفي بالرنين النووي المغناطيسي والتي سمحت بعزل ستة مركبات فلافونويدية.

لقد تمت دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للمستخلص المائي والمستخلصات العضوية لأوراق *Limoniastrum feei* داخل الجسم الحي، أما دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات فقد تمت داخل المختبر. المعالجة الموضوعية لذمة الفأر الناجمة عن حقن الفورمول ب 25مغ \ كغ من المستخلص المائي للاوراق اما مستخلص الأستون ومستخلص أسيتات الإيثيل ب 50 مغ /كغ تبدي تأثيرا عاليا ضد الإلتهاب ( $p < 0,001$ ) مقارنة مع مجموعة الفئران الشاهدة ب 27.85%، 71.85%، 52% على التوالي. أما مستخلص البوتانولي يبدي تأثيرا أقل من ديكلوفناك.

لقد تمت دراسة النشاط المضاد لاكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة تثبيط الجذر الحر DPPH. وقد تبين ان القدرة المضادة لاكسدة كانت كبيرة بالنسبة للمستخلص المائي والأستوني.


الكلمات المفتاحية: *Limoniastrum feei*، فلافونويدات، القدرة المضادة للأكسدة، القدرة المضادة للالتهاب، ذمة

RMN، CCM، DPPH،

---

## RÉSUMÉ

---

 Les études que nous avons entreprises concernent la détermination des composés polyphénoliques de l'espèce *Limoniastrum feei*. L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que la spectroscopie d'absorbance ultraviolette, infrarouge et la résonance magnétique nucléaire, qui ont permis d'isoler six composés flavonoidiques.

Les activités anti-inflammatoires et antioxydantes de l'extrait aqueux et des extraits organiques de feuilles de *Limoniastrum feei* ont été étudiés *in vivo* et *in vitro* respectivement. Le traitement IP de l'œdème de la patte par 25mg/Kg PC d'extrait aqueux des feuilles ou l'extrait acétonique et l'extrait d'acétate d'éthyle par 50 mg/Kg PC des feuilles induit une diminution très significative ( $p < 0,001$ ) de l'inflammation par rapport au groupe témoin, de 85 %, 85,71%, 52,27% respectivement et l'extrait butanolique des feuilles donne un effet inhibiteur plus faible (37,14 %), par rapport au diclofénac aux doses utilisées.

L'effet antioxydant des mêmes extraits aqueux et les extraits organiques sont testés *in vitro* en utilisant le test du DPPH, montre que l'extrait aqueux et l'extrait acétonique possèdent une activité antioxydante importante.

**Mots clé :** *Limoniastrum feei*, flavonoïdes, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, œdème, DPPH, CCM, RMN.

---

---

## ABSTRACT

---

This Studies that we undertook concern the determination of flavonoids of the species *Limoniastrum feei*. The extraction and purification of the different constituents, based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination, performed by physico-chemical and spectroscopic methods, such as ultraviolet and nuclear magnetic resonance spectroscopy, allowed us to isolate six simples flavonoids derivatives;

The anti-inflammatory and antioxidant of aqueous extract and organic extracts of leaf of *Limoniastrum feei* were studied in vivo and in vitro respectively. Treatment IP of edema of the paw with 25mg/Kg PC of aqueous extract of leave or acetone extract and fraction ethyl acetate with induced a significant decrease ( $p < 0.001$ ) in inflammation compared to the control group, 85%, 85,71% and 52,27% respectively. The butanol fraction of the leaves gives a lower inhibitory effect (37,14%), but almost equal to that of diclofénac at used doses.

The antioxidant effect of the same aqueous extract and the organic extracts were tested in vitro using the DPPH test shows that the aqueous extract and acetone extract possess a strong activity DPPH radical scavenger.

**Keywords:** *Limoniastrum feei*, flavonoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, edema, DPPH, TLC, NMR.

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

°C	Degré Celsius
%	pourcentage
AAS	Acide acétyl salicylique
AlCl <sub>3</sub>	chlorure d'aluminium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutérié
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane
cm	Centimètre
Cm <sup>-1</sup>	Unité de la fréquence en centimètre moins un
d	Doublet
dd	doublet des doublets
DPPH	1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
g	gramme
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
Ha	Hydrogène axial
Hb	Hydrogène équatorial
HCl	acide chlorhydrique
Hz	Hertz
IR	Infrarouge
J	Constante de couplage
KBr	Bromure de potassium
Km	Kilomètre
LPSO	Laboratoire de Phytochimie et synthèse organique
m	Multiplet
MeOH	Méthanol
MHz	Mega Hertz
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
PPM	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN <sup>13</sup> C	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire de carbone 13



RMN 1H	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire du proton
s	<i>Singulet</i>
SM	Spectroscopie de masse
t	<i>Triplet</i>
TMS	Tetraméthylsilane
UV	Ultraviolet
$\delta$	Déplacement chimique
$\lambda$	longueur d'onde
$\nu$	Nombre d'onde
SRAT	Schéma Régional d'Aménagement du Territoire
h	heur
w	watt
<i>L. feei</i>	<i>Limoniastrum feei</i>
<i>ESL</i>	<i>Extraction n solide liquide</i>
<i>ELL</i>	<i>Extraction n liquide - liquide</i>
<i>Eaq</i>	<i>Extrait aqueux</i>
HSV-1	virus de l'herpès simplexe type-1
BHT	L'hydroxytoluène butylé
CI50	la demi (50 %) concentration inhibitrice
$\mu\text{g}$	microgramme

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
<b>Tableau 1.1</b>	Investigation bibliographique sur la phytochimie des genres les plus étudiés (Limonium et Plumbago). 08
<b>Tableau 1.2</b>	Acides phénoliques isolés à partir des Plumbaginaceae 16
<b>Tableau 2.1</b>	Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes 25
<b>Tableau 2.2</b>	Quelques espèces réactives de l'oxygène 27
<b>Tableau 2.3</b>	Exemples de maladies liées à l'inflammation 33
<b>Tableau 2.4</b>	Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires 37
<b>Tableau 3.1</b>	Paramètre géographique et bioclimatique des stations d'étude 40
<b>Tableau 4.1</b>	Résultats de la chromatographie sur couche mince sur gel de silice de l'extrait acétone/eau, Système 1 (E1) acétone / toluène / acide formique (6/8/1), système 2 (E2) acétate d'éthyle /Méthanol /eau (10/1,5/1). 53
<b>Tableau 4.2</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H et RMN 13 C de <b>LF1</b> dans CDCl <sub>3</sub> . 57
<b>Tableau 4.3</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H et RMN 13 C de <b>LF2</b> dans CDCl <sub>3</sub> . 60
<b>Tableau 4.4</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H et RMN 13 C de <b>LF3</b> dans CDCl <sub>3</sub> . 63
<b>Tableau 4.5</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H de <b>LF4</b> dans CDCl <sub>3</sub> . 65
<b>Tableau 4.6</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H de <b>LF5</b> dans CDCl <sub>3</sub> . 67
<b>Tableau 4.7</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H de <b>LF6</b> dans DMSO-d <sub>6</sub> . 68
<b>Tableau 4.8</b>	Activité antioxydant (%) et valeurs des IC <sub>50</sub> (concentration finale) trouvées pour les différentes fractions, les extraits bruts et les trois flavonoïdes isolé de la partie feuille de <i>L. feei</i> . 70
<b>Tableau 4.9</b>	L'effet toxique par voie intra-péritonéale des l'extraits étudier de <i>Limoniastrum feei</i> sur le comportement des animaux et le taux de mortalité. 74
<b>Tableau 4.10</b>	Effet des extraits étudier et diclofénac sur l'œdème plantaire induit par la formole chez les souris 76
<b>Tableau 4.11</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H et RMN 13 C de flav9 dans CDCl <sub>3</sub> 72
<b>Tableau 4.12</b>	Déplacements chimiques en RMN 1H et RMN 13 C de flav-6 dans CDCl <sub>3</sub> 72
<b>Tableau 4.13</b>	Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H du composé FLAV11 72
<b>Tableau 4.14</b>	Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H du compose FLAV12 74
<b>Tableau 4.14</b>	Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H du compose FLAV13 77
<b>Tableau 4.15</b>	Activité antioxydant (%) et valeurs des IC <sub>50</sub> (concentration finale) trouvées pour les différentes fractions, les extraits bruts et les trois flavonoïdes isolés de la partie feuille de <i>L. feei</i> . 78
<b>Tableau 4.16</b>	L'effet toxique par voie intra-péritonéale des l'extraits étudier de <i>Limoniastrum feei</i> sur le comportement des animaux et le taux de mortalité. 80
<b>Tableau 4.17</b>	Effet des extraits étudier et diclofénac sur l'œdème plantaire induit par la formole chez les souris 82

## LISTE DES FIGURES

	page
<b>Figure 1.1</b>	Carte Géographique présentant la région de Béchar 04
<b>Figure 1.2</b>	Structures de quelque flavonoïde isolé à partir des Plumbaginaceae 13
<b>Figure 1.3</b>	Structures des coumarines isolées à partir des Plumbaginaceae 15
<b>Figure 1.4</b>	Structures des naphthoquinones isolées à partir des Plumbaginaceae 16
<b>Figure 1.5</b>	Structures des acides phénoliques isolées à partir des Plumbaginaceae 17
<b>Figure 1.6</b>	Aspect Morphologique de l'espèce <i>Limoniastrum feei</i> 18
<b>Figure 2.1</b>	Structure des caroténoïdes 24
<b>Figure 2.2</b>	Structure moléculaire de $\alpha$ -tocophérols 25
<b>Figure 2.3</b>	Structure de l'acide ascorbique 25
<b>Figure 2.4</b>	Réaction des flavonoïdes avec les espèces oxygénées réactives avec FIOH : flavonoïde, FIO <sup>•</sup> : flavonoïde sous forme radicalaire. 29
<b>Figure 2.5</b>	Réaction des flavonoxy avec les EOR 29
<b>Figure 2.6</b>	Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques 30
<b>Figure 2.7</b>	mécanisme d'action des AINS 34
<b>Figure 2.8</b>	Mécanisme d'action des glucocorticoïdes 35
<b>Figure 3.1</b>	situation géographique des stations de collecte 40
<b>Figure 3.2</b>	Schéma du fractionnement ELL adopté pour le partage en cinq extrait (LFf1, LFf2, LFf3 et Extrait aqueux) des extraits bruts hydro-acétonique des extraits bruts hydro-acétonique 43
<b>Figure 4.1</b>	Rendement d'extraction (%) obtenu par ESL 51
<b>Figure 4.2</b>	Structures proposées du composé <b>LF1</b> , la 6, 7, 8, 3', 4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone 56
<b>Figure 4.3</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF1</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 56
<b>Figure 4.4</b>	Spectre RMN- 13 C de <b>LF1</b> (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 56
<b>Figure 4.5</b>	Structures proposées du composé <b>LF2</b> , la 3', 5 hydroxy 7, 4', 5'-trimethoxy flavonol 58
<b>Figure 4.6</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF2</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 59
<b>Figure 4.7</b>	Spectre RMN- 13 C de <b>LF2</b> (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 59
<b>Figure 4.8</b>	Structures proposées du composé <b>LF3</b> , la 5, 7-dihydroxy 6, 5'-dimethoxy flavone 61
<b>Figure 4.9</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF3</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 62
<b>Figure 4.10</b>	Spectre RMN- 13 C de <b>LF3</b> (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 62
<b>Figure 4.11</b>	Structures proposées du composé <b>LF4</b> , la 3-O-(glucoside-6''-malonyl, 2''-ramnosyl) 5, 7, 3', 4', 5'-Pentahydroxy flavonol. 64
<b>Figure 4.12</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF4</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 64
<b>Figure 4.13</b>	Structures proposées du composé <b>LF5</b> , la 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin) 66
<b>Figure 4.14</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF5</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 66
<b>Figure 4.15</b>	Structures proposées du composé <b>LF6</b> , la 5, 4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine) 68

<b>Figure 4.16</b>	Spectre RMN- 1 H de <b>LF6</b> (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	68
<b>Figure 4.17</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique.	69
<b>Figure 4.18</b>	profile de l'activité antioxydant (%) au test DPPH	71
<b>Figure 4.19</b>	L'effet toxique des 'extraits sur le comportement des animaux. A : hypoactivité des animaux, B : somnolence, C : activité des animaux témoins.	75
<b>Figure 4.20</b>	Evolution de l'inflammation (œdème plantaire) en fonction du temps pour les différents groupes ; groupe A :témoin traité avec le sérum physiologique (10 ml/Kg PC) ; Groupe B : traité avec l'extrait aqueux (25 mg /Kg PC) ; Groupe C : traité avec l'extrait acétonique (50 mg /Kg PC) ; Groupe D : traité avec l'extrait d'acétate d'éthyle Lf2 (50 mg /Kg PC) ; Groupe E : traité avec l'extrait butanolique Lf3 (100 mg /Kg PC) ; Groupe F : traité avec diclofénac (25 mg /Kg PC) ;	77
<b>Figure 4.21</b>	Inhibition de l'œdème chez les différents lots de souris ,en présence d'un prétraitement ,par voie ip, Groupe B : traité avec l'extrait aqueux (25 mg /Kg PC) ; Groupe C : traité avec l'extrait acétonique (50 mg /Kg PC) ; Groupe D : traité avec l'extrait d'acétate d'éthyle Lf2 (50 mg /Kg PC) ; Groupe E : traité avec l'extrait butanolique Lf3 (100 mg /Kg PC) ; Groupe F : traité avec diclofénac (25 mg /Kg PC) ;	78
<b>Annexe 1</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF1</b> , le 6, 7, 8,3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone	
<b>Annexe 2</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF2</b> , le 3',5 hydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol	
<b>Annexe 3</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF3</b> , la 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone	
<b>Annexe 4</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF4</b> , la 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5, 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol	
<b>Annexe 5</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF5</b> , la 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin)	
<b>Annexe 6</b>	Spectre IR et Structures proposées du composé <b>LF6</b> , la 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine)	
<b>Annexe 7</b>	Pléthysmomètre LE 7500	



# *Table des matières*



# Table des Matières

<b>Liste des abréviations et Symboles.....</b>	<b>I</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>IV</b>
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre 1 : Présentation Du Matériel Végétal Etudié .....</b>	<b>03</b>
1.1 Introduction.....	03
1.2 Présentation de la zone d'étude .....	04
1.2.1 Situation géographie .....	04
1.2.2 Caractéristiques climatologiques.....	05
1.2.3 Relief .....	05
1.3 Présentation de la plante étudiée .....	05
1.3.1 Famille des Plombaginacées .....	05
1.3.2 Caractères généraux de la famille Plumbaginacée .....	06
1.4 Utilisation traditionnels médicinales des Plumbaginacée .....	06
1.5 Etude pharmacologique des Plumbaginacée .....	07
1.6 Phytochimie de la famille des Plombaginacées.....	08
1.6.1 Flavonoïdes .....	11
1.6.2 Coumarines .....	14
1.6.3 Naphtoquinones .....	15
1.6.4 Huiles essentielles .....	16
1.6.5 Divers .....	16
1.7 Genre <i>Limoniastrum Moench</i> .....	17
1.7.1 Caractères généraux du genre <i>Limoniastrum Moench</i> .....	18
1.7.2 L'espèce <i>Limoniastrum feei (De Gir.) Batt.</i> .....	18
1.7.3 Dénomination et synonyme.....	19
1.7.4 Classification .....	19
1.7.5 Ethnopharmacologie .....	19
1.7.6 Travaux antérieurs .....	19
1.8 Conclusion .....	20

<b>Chapitre 2 antioxydant et anti inflammatoire</b> .....	21
2.1 Antioxydant.....	21
2.2.1 Définition .....	22
2.1.2 Les systèmes de protection contre le stress oxydant (les antioxydants.....	23
2.1.2.1 Définition .....	23
2.1.2.2 Mécanismes d'action des antioxydants.....	23
2.1.3 Principaux antioxydants.....	23
2.1.3.1 Antioxydants endogènes .....	23
2.1.3.2 Antioxydants exogènes .....	24
a) Antioxydants synthétiques.....	24
b) Antioxydants naturels.....	24
2.1.4. Les flavonoïdes comme antioxydants.....	26
2.1.5. Les radicaux libres.....	26
2.1.5.1. Définition.....	26
2.1.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène .....	27
2.1.5.3 Mécanisme d'action des radicaux libres.....	27
2.1.6 Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires .....	28
2.1.6.1 Protéines et acides aminés .....	28
2.1.6.2 Lipides.....	28
2.1.6.3 Acides nucléiques .....	28
2.1.7 Piégeage des radicaux libres.....	28
2.1.8 Chélation des ions métalliques .....	29
2.1.9 Inhibition de diverses enzymes.....	30
2.1.10 Evaluation de l'activité antioxydant .....	30
2.1.11 Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres .....	30
2.2 l'inflammatoire .....	31
2.2.1 Définition.....	31
2.2.2 L'inflammation aigüe.....	31
2.2.3 L'inflammation chronique.....	31
2.2.4 Réaction inflammatoire.....	32
2.2.5 Pathologies inflammatoires.....	33
2.2.6 Anti- inflammatoires.....	33
2.2.6.1 Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) .....	33
2.2.6.2 Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS) .....	34
2.2.6.3 Méthodes de tests anti-inflammatoires.....	36
2.2.6.4 Anti-inflammatoires d'origine végétale .....	37
2.3 Conclusion .....	38
<b>Chapitre 3 : Matériel et Méthodes</b> .....	39
3.1 Matière végétale.....	39
3.1.1 Identification des plantes.....	39
3.1.2 Récolte de la plante .....	39
3.2 Préparation des extraits .....	41
3.2.1. Préparation des échantillons .....	41
3.2.2 Préparation des extraits bruts par Extraction Solide-Liquide (ESL).....	41
3.2.3 Fractionnement de l'extrait hydro-acétonique par Extraction Liquide-liquide (ELL).....	42

3.3. Séparation et Purification.....	43
3.3.1. Purification des composés par chromatographie sur colonne ouvert (CO).....	44
3.3.2. Purification des composés par chromatographie liquide sur colonne par LC-UV.....	45
3.4. Purification des composés .....	45
3.4.1 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des feuilles LFF1.....	45
3.4.2 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des feuilles LFF2.....	45
3.4.3 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des feuilles LFF3.....	45
3.4.4 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des tiges LFT1.....	46
3.4.5 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des tiges LFT2.....	46
3.4.6 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des tiges LFT3.....	46
3.4.7 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des rameau LFR1.....	46
3.4.8 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des rameau LFR2.....	46
3.4.9 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des rameau LFR3.....	46
3.5. Caractérisation des produits obtenus .....	47
3.5.1 Spectrophotométrie ultraviolet (UV) .....	47
3.5.2 Spectroscopie infrarouge (IR).....	47
3.5.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	47
3.6. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant.....	47
3.7. Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire .....	48
3.7.1 Matériel Animal .....	48
3.7.2 Appareils .....	49
3.7.3 Etude de la toxicité aiguë des extraites.....	49
3.7.4 Test anti-inflammatoire.....	49
3.7. Analyse statistique .....	50
3.8 Conclusion.....	50
<b>Chapitre 4 : résultats et discussion .....</b>	<b>51</b>
4.1 Rendements en extraits bruts.....	51
4.1.2 Purification des composés.....	52
4.1.3 Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait acétone /eau.....	52
4.2 Analyse structurale des composés.....	54
4.2.1 Elucidation structurale du composé LF1.....	54
4.2.2 Elucidation structurale du composé LF2.....	57
4.2.3 Elucidation structurale du composé LF3 .....	60
4.2.4 Elucidation structurale du composé LF4 .....	63
4.2.5 Elucidation structurale du composé LF5 .....	65
4.2.6 Elucidation structurale du composé LF6.....	67
4.3 Activités biologiques.....	69
4.3.1 Activité antioxydant .....	69
4.3.2 Toxicité aiguë par voie intra-péritonéale .....	73
4.3.2.1 Observations cliniques et de survie .....	74
4.3.2 Activité Anti-inflammatoire .....	76
4.3 Conclusion.....	80





# *Introduction Générale*



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

**A**u fil des temps, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, vêtements et pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes, pour le traitement des maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire de l'humanité.

Les substances naturelles végétales sont recherchées en raison de leurs activités biologiques nombreuses qui promeuvent des effets positifs sur la santé. Ces activités comprennent des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, insecticides, antipaludiques, antioxydantes et anticancéreuse utilisées dans les secteurs industriels pharmaceutiques et de l'agriculture (**GURIB-FAKIM, 2006**).

L'apport des études ethno-pharmacologique ont permis la sélection des plantes pour la recherche de nouvelle source de médicament. Il est à noter que dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas se baser pour le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire. Ainsi, les substances naturelles et leurs analogues de synthèse ont souvent été étudiés pour leurs intérêts biologiques et la recherche de nouveaux agents thérapeutiques, et au fil des temps, différentes techniques ont été développées pour l'obtention des produits naturels ayant des effets biologiques ciblés (**BELBOUKHARI & CHERITI, 2008 ; CHERIT et al., 2012**).

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs produits (**PELT, 2006**).

Par conséquent, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales et la phytochimie a connu un essor considérable grâce à l'apport de diverses disciplines scientifiques comme la chimie, la pharmacologie, la biochimie, la microbiologie, et la médecine.

L'Algérie, est un pays qui est connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (AMELIE,2007).

Plusieurs plantes sahariennes, fréquemment utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, se sont vues reconnaître un effet thérapeutique au cours des siècles. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'isolement et à l'identification de principes actifs (BABAAMER *et al.*, 2012 ; SEKKOUM *et al.*, 2014).

La famille des plumbaginacées est connue pour être cosmopolite et d'une grande diversité tant sur le plan botanique que chimique. Elle est de moyenne importance comptabilisant sept cent soixante-quinze espèces de plantes dicotylédones et angiospermes (plantes à fleurs) répertoriées dans une bonne vingtaine de genres. Elle offre plusieurs plantes largement utilisées en médecine traditionnelle. Parmi les espèces représentant cette famille dans le Sahara algérien, *Limoniastrum feei*. Cette espèce endémique à l'Algérie a fait l'objet de deux études phytochimiques antérieures . les deux études réalisée sur les partie aériennes a conduit à l'isolement et la caractérisation de polyphenol.

Ce travail est s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources végétales dans la zones arides, notamment en termes de plantes médicinale utilisées traditionnellement . La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire une étude ethnobotanique, suivie par une extraction et une analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique. Parmi ces composés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux doués d'une activité antioxydante et anti-inflammatoire .

L' espèces que nous avons étudié est : *Limoniastrum feei* de la famille des Plumbaginacées, une plante endémique de la pharmacopée traditionnelle du sud ouest Algérien. *Limoniastrum feei* est une des plantes médicinales employées pour traiter les infections gastriques et les infections des poumons (BELBOUKHARI & CHERITI ,2006).

Dans un premier temps, ce travail est scindé en deux partie, d'une part une recherche bibliographique portant sur la botanique, les données bioclimatiques .D'autre part, une approche expérimentale qui s'articule de trois axes :

- Extraction et purification des constituant de la partie aérienne de la plante
- Analyse et identification des produits isolés
- Evaluation de l'activité anti-oxydante et anti- inflammatoire des extraits bruts et des produits purs.



*Chapitre 1*  
*Présentation du matériel*  
*végétal étudié*



# CHAPITRE 1

## PRÉSENTATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ETUDIÉ

### 1.1. Introduction

Par sa superficie, l'Algérie est classée dixième pays au monde et deuxième en Afrique. Elle offre une mosaïque riche d'écosystèmes et de biodiversité qui est attribuée aux variations larges de climat (**BOUKHALFA, 2001**).

La majorité du territoire national (Sahara algérien) est citée parmi les zones arides du monde, où les conditions climatiques sont très extrêmes pour que des plantes sauvages puissent y survivre, mais ces derniers en s'adaptant, elles synthétisent des substances actives, dites métabolites secondaires, qui ne sont pas vitales, mais elles sont d'un intérêt pour elles. Ces substances en plus de leur intérêt dans l'organisme de ces plantes, elles rendent ces dernières plus intéressantes du point de vue composition chimique. Ce qui vient étayer la croyance selon laquelle les métabolites secondaires jouent un rôle primordial dans la lutte contre les maladies et les herbivores (**ERNEST & PAUL, 2000**). Ils se produisent normalement en tant que composés mineurs à faible concentrations (**ROHLOFF, 2003**), **MENDELSON & BALICK (1995)** estiment à 500 000 leur nombre total chez les plantes. En fonction de la nature chimique des composés, les métabolites secondaires peuvent se classer dans deux groupes : 1) les métabolites secondaires azotés dont les alcaloïdes étant les plus abondants ; 2) les métabolites secondaires non azotés dont les phénols et les terpènes étant les plus remarquables (**ELENA, 2006**).

La médecine traditionnelle à base de plantes continue à nous livrer des surprises et nous intriguer. D'ailleurs, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît (**ISERIN, 2001**).

La plante qui font l'objet de cette étude est classée parmi les plus populaires dans la région Sud-Ouest. Ceci nous a été révélé lors de l'enquête ethno-pharmacologique effectuée dans la région de Béchar (**CHERITI, 2000**).

Nous présentons dans ce chapitre, les caractéristiques de la zone d'étude, la classification et la description botanique de la plante étudiée ainsi que leurs usages traditionnels, leur composition chimique et leur répartition géographique.

## 1.2. Présentation de la zone d'étude

### 1.2.1 Situation géographique

La wilaya de Béchar est considérée comme la plus grande wilaya du sud-ouest algérien située dans l'ouest du Sahara algérien. Elle correspond à une partie de l'ancien département de la Saoura dont elle était le chef-lieu, s'éloigne de 1150 km au sud-ouest de la capitale Alger, et 852 km de la wilaya de Tindouf et à environ 80 km à l'ouest de la frontière marocaine.

La wilaya constitue un pôle important dans le Schéma Régional d'Aménagement du Territoire (SRAT). Sa position spatiale et son tracé frontalier de plus de 600 Km avec le Royaume marocain lui confèrent cette vocation régionale de premier ordre. La wilaya de Béchar s'étend sur une superficie de 161400 Km<sup>2</sup>. Elle est située à une distance de 950km au Sud-ouest de la capitale Alger. Elle est limitée (DPAT ,2010) :

- à l'Est par la Wilaya d'Adrar,
- à l'Ouest par le Royaume du Maroc,
- au Nord par les Wilayas de Naâma et d'El Bayadh,
- au Sud par les Wilayas de Tindouf et d'Adrar.



**Figure 1.1** Carte Géographique présentant la région de Béchar (Données cartographiques google 2013).

## 1.2.2 Caractéristiques climatologiques

La région de Béchar se situe au sud-ouest algérien, avec une superficie de 161 400 km<sup>2</sup>, soit 6.77 % environ du territoire national (DPAT, 2010). Elle est située à une altitude de 769 m et appartient à la zone climatique présaharienne avec deux saisons principales (été et hiver). Avec une forte insolation, dépassant les 3500h/an, et un intense rayonnement solaire direct qui peut atteindre 800 W/ m<sup>2</sup> sur un plan horizontal. En été la température dépasse facilement les 50°C à l'ombre, et l'humidité relative reste faible autour de 27 %. Par ailleurs, en hiver la température extérieure peut descendre à -5°C la nuit avec des précipitations rares et irrégulières de l'ordre de 60 mm/an. En plus, on assiste pendant les demi-saisons à de violents vents de sables qui peuvent atteindre 100 km/h (MOKHTARI et al., 2008 ; OZENDA, 2004).

## 1.2.3 Relief

Le territoire de la wilaya de Béchar est formé de cinq (5) principaux reliefs:

- **Les montagnes:** elles sont dénudées et parfois élevées. Le Djebel Antar (1.953 m), le Djebel Grouz (1.835m) et le Djebel Béchar (1.206 m).
- **Les Oueds:** six principaux oueds sillonnent la wilaya. Du Nord au Sud on rencontre: l'Oued Namous, l'Oued Zouzfana, l'Oued Béchar, l'Oued Guir, l'Oued Saoura et l'Oued Daoura.
- **Les vallées:** ce sont des dépressions façonnées par les cours d'eau importants. Les principales sont celles de la Zouzfana, du Guir et de la Saoura.
- **Les Regs (Hamada):** ce sont de vastes étendues rocailleuses. Les plus importantes sont celles de Guir et Daoura.
- **Les ergs:** Ils représentent des massifs dunaires pouvant atteindre jusqu'à 300 m de hauteur. Les ergs existants portent le nom de : Grand Erg Occidental, Erraoui, Erg El Atchane, et l'Erg Iguidi (CORRERA,2006 ;DPAT ,2010) .

## 1.3 Présentation de la plante étudiée

### 1.3.1 Famille des Plombaginacées

La famille des Plumbaginaceae (ou Plombaginaceae) comprend environ 650 espèces regroupées en 27 genres, c'est une famille cosmopolite (KUBITZKI , 1993 ) mais surtout centré sur la méditerranée et l'Asie. Cette famille est retrouvée dans tous les milieux salins

des régions tropicales et régions froides, c'est une famille qui est subdivisée en deux sous-familles : la Plumbagoideae la Staticoideae (DOLORES *et al.*, 2005)

Elle comprend des plantes herbacées ou des arbustes, Leurs feuilles sont groupées en grappes d'épillets ;chaque épillet, qui comporte 1 à 3 fleurs est ordinairement entouré de trois bractées dont la morphologie est importante dans la reconnaissance des espèces. La corolle est souvent incluse dans la calice, lui-même plus ou moins coloré (OZENDA,1983).

### 1.3.2 Caractères généraux de la famille Plumbaginaceae

Les composants de cette famille sont des herbacées ou des arbustes, plus rarement des lianes.

- Feuilles : alternes ou en rosette basale sans stipules en général.
- Inflorescence en cyme ou en capitule (Staicoideae), rarement spiciforme (Plumbagoideae).
- Les fleurs : sont actinomorphes, pentamères en général en épillets munis des bractées.
- Calice tubulaire, persistant.
- Corolle : gamopétales à tube généralement court ou très court.
- Androcée : obisostémones à étamines épipétales.
- Ovaire : supère uniloculaire
- Les fruits : un akène ou une capsule à une graine à déhiscence irrégulière, entouré par calice persistant (TUTIN *et al.*,1972).

### 1.4 Utilisation traditionnels médicinales des Plumbaginaceae

De nombreuses espèces et genres des Plumbaginaceae ont fait partie de l'arsenal de la médecine traditionnelle de plusieurs populations mondiales, il est noté que l'espèce *Limoniastrum feei* (plante native de sud est Algérien) a généralement été utilisée afin de traiter la bronchite et les infections intestinale ( CHERITI,2000).

Dans le sud tunisien les feuilles, les branches et les galles de l'espèce *Limoniastrum guyonianum* sont indiquées en tant que remède dysenterie (HAMMAMI *et al.*, 2011).

Dans La médecine traditionnelle indienne les racines de l'espèce *Plumbago zeylanica* sont largement usées pour leurs vertus : laxatives, astringents, dysenteries, expectorantes et abortives (KUMAR *et al.*, 2009).



En Chine les feuilles sont prescrites afin de traiter le rhumatisme, les parasites intestinaux, l'anémie ( **JINGSU, 1979** ), et la malaria (**DHALE & MARKANDEY, 2011**) on note aussi que cet espèce possède des propriétés anti-hypodermique (**PENDURKAR, 2009**), anti ostrogénique (**SHEEJA et al., 2001**), anti fertilité (**DUTTA et al., 2002**) et anticancer de prostate (**MOAMMIR et al., 2008**).

En Chine toujours l'espèce *Limonium sinense* est largement employée à des fins curatives. Elle soumise l'hémorroïde, la fièvre, l'hépatite, la diarrhée et la bronchite (**LI, 1978**; **JIANGSU, 1977**). L'infusion des racines de *Limonium brasiliense* (espèce répartie en Argentine, Uruguay et dans le sud du Brésil) a été traditionnellement utilisée pour le traitement de l'hémorragie et de rhumatisme, ainsi que pour ses propriétés cardioprotectives (**DE PAIVA et al., 2003**).

## 1.5 Etude pharmacologique des Plumbaginaceae

Plusieurs études à visées pharmacologiques ont été menées sur les plumbaginaceae dans le but de préciser les différentes activités biologiques des extraits et celles des métabolites isolées à partir de différents taxons.

L'étude de l'activité antivirale menée sur l'extrait éthanolique de l'espèce *Limonium sinense* a montré une activité contre le virus de l'herpès simplexe type-1 (HSV-1) (**DE PAIVA et al., 2003**). Une autre étude réalisée sur la même espèce confirme leurs propriétés hépatoprotectives (**CHAUNG et al., 2003**; **KUO et al., 2002**).

Le myricétine-3- $\alpha$ -D-sorbose fut isolé à partir de l'extrait alcoolique des feuilles de l'espèce *Limonium axillare* a montré une activité anticancéreuse contre le cancer CNS et le cancer de seins (**KANDIL et al., 2000**).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis au radical DPPH de l'extrait méthanolique de l'espèce *Limonium axillare* a révélé une remarquable activité de 95 $\pm$ 0.5% avec la concentration de 1 mg/ml seulement par rapport à l'antioxydant de synthèse le BHT (95 $\pm$  0.1 % avec la concentration de 5mg/ml) (**BOURIFA et al., 2010**). L'acide gallique est l'un des composés actifs isolés à partir de l'extrait aqueux de l'espèce *Limonium wrightii* a mis en évidence l'activité anti radicalaire avec une CI<sub>50</sub> de 2.63 $\mu$ g/ml vis-à-vis le radical DPPH (**ANIYA et al., 2002**). L'extrait méthanolique des racines de l'espèce *Limonium brasiliense* possède une activité antioxydante (**MURRAY et al., 2004**).

L'activité antibactérienne et anti fongique des *Plumbaginaceae* a été confirmée par des études in vitro, dans ce contexte on cite les tests biologiques réalisés sur l'extrait méthanolique de l'espèce *Limonium feei* qui ont montré une importante activité vis-à-vis aux toutes les souches bactériennes étudiées, es étant (*S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. coli*, *K.*

*pneumoniae*, *E. fecalis*, *S. cervisinae*), à l'instar de l'activité antibactérienne, l'extrait méthanolique de même espèce a aussi marqué une activité antifongique vis-à-vis au souche *C. albican* (BELBOUKHARI & CHERITI 2005).

## 1.6 Phytochimie de la famille des Plumbaginacées

Les espèces et les genres des Plumbaginaceae ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin de déterminer leur composition en métabolites secondaires et notamment les flavonoïdes, les coumarines, les acides phénolique, et les quinones (LEFAHAL, 2014). Le tableau 1.1 mentionnent l'étude bibliographique menée sur les espèces les plus étudiées :

**Tableau 1.1** : Investigation bibliographique sur la phytochimie des genres les plus étudiés (*Limonium* et *Plumbago*)

Composés	Espèces	Références
Myricétine-3-O-β-D-galactopyranoside 1 Myricétine-3-O-α-L-rhamnopyranoside 2 Quercétine-3-O-β-D-glucopyranoside 3 Quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside 4	<i>Limonium tetragonum</i>	(JUNG IM et al., 2011)
Myricétine-3-O-β-galactopyranoside 1 Myricétine-3-O-α-L-rhamnopyranoside 2 Quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside 4 Quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranoside 5 Myricétine-3-O-β-glucopyranoside 6 Myricétine-3-O-α-L-arabinopyranoside 7 Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)-β-galactopyranoside 8 Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)-β-glucopyranoside 9 Myricétine 10, Quercitine 11, Kaempferole 12 Naringenine 13, Homoeriodityol 14, Eriodictyol 15, Homoeriodictyol-7-O-β-D-glucopyranosid 16 Myricétine-7-O-α-L-rhamnopyranoside 17	<i>Limonium aureum</i>	(GUAN & CHENGGANG, 2006)
Myricétine 10, Quercitine 11, Kaempferole 12 Luteoline-7-O-glucoside 28 Luteoline 29, Apiine 30, Apegenine 31	<i>Limonium axillare</i>	(KORUL KINA et al., 2004) (AHMED et al., 1999 ; (GUNASEKARAN & CHAUHAN,

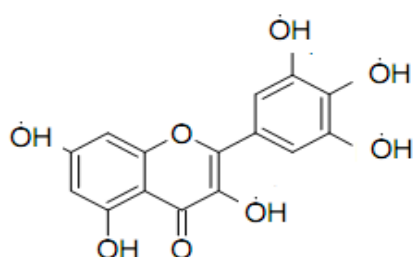


Samargenine B 44		(YUH-CHI et al., 2002)
Myricétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 2 Myricétine 10	<i>Limonium caspium</i>	(MOVSUMOV, 1996).
Myricétine-3-O- $\beta$ -galactopyranoside 1 Myricétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 2 Myricétine 10, Quercitrine 11, Kaempferole 12 (-)-Epigallocatechine-3-O-gallate 22 6,3',4'-tri-methoxy 3, 5,5'-tri-hydroxy flavonol 45, 3-(6''-malonyl 2''-ramnosyl glu) – 6,3',4'-tri-methoxy- 5,5'-dihydroxy flavonols 46 Tetraacetate 7-dihydroxy-4'-methoxy -8-O- $\beta$ - glucopyranoside isoflavone 47 Hexaacetate 8-hydroxy-4',7-dihydroxy isoflavone 8-O-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -glucopyranoside 48	<i>Limoniastrum feei</i>	(CHAABI et al., 2008)  (DE PAIVA, 2002) (BELBOUKHARI & CHERITI, 2007)
Myricétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 2 (-)-Epigallocatechine-3-O-gallate 22 (-)-Epigallocatechine 23, (+)-Gallocatechine 24 Delphinidine-3- rhamnoside 51 Delphinidine-3- glucoside 52 Delphinidine-3,5- di-glucoside 53	<i>Limonium brasiliense</i>	(KANDIL et al., 2000)
Apegenine-7-O-glucoside 49, Quercitrine 39 Orientine 50	<i>Plumbago scandence</i>	(DE PAIVA et al., 2002)
Apegenine-7-O-glucoside 49, Quercitrine 39 Orientine 50	<i>Plumbago auriculata</i>	(DE PAIVA et al., 2002)
(+)-Gallocatechine 24, (-)-Epigallocatechine 23, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate 22 .	<i>Limoniastrum guyonianum</i>	(TRABELSI et al., 2012) (TRABELSI et al., 2013)

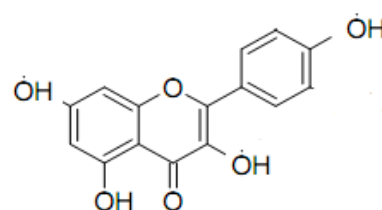
### 1.6.1 Flavonoïdes

Les Plumbaginaceae sont caractérisés par la diversité de leurs métabolismes flavonoidiques. On y rencontre en effet des flavones, des flavonols, des flavanones, des aurones, des chalcones, des iso flavonoïdes ainsi les anthocyanidines (LEFAHAL, 2014). Le tableau suivant mentionnent l'étude bibliographique menée sur les espèces les plus étudiées :

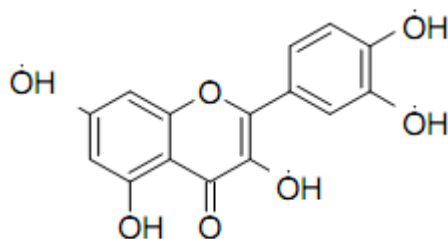
**Tableau 1.1 :** différents flavonoïdes isolés à partir des Plumbaginaceae.



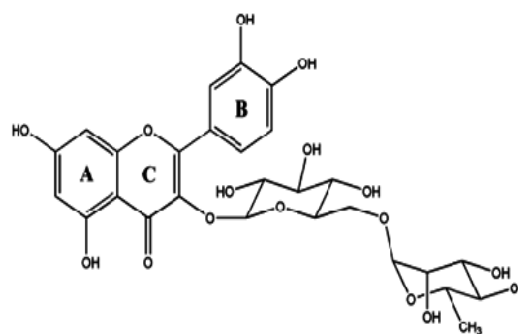
**10:** Myricétine



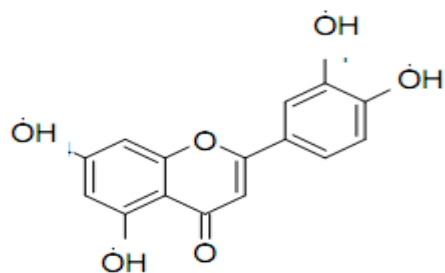
**12:** Kaempferole



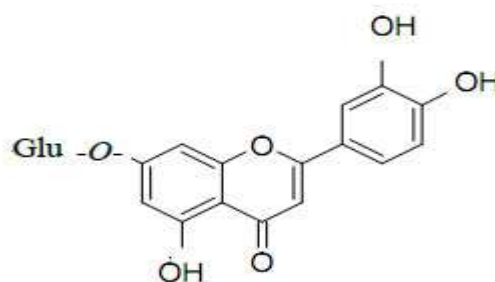
**11:** Quercitine



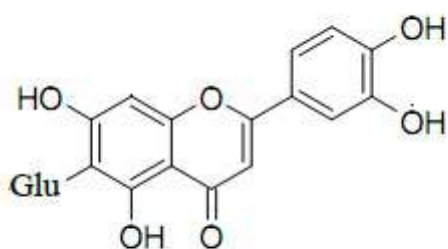
**19:** Rutine



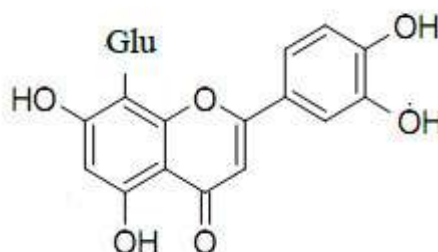
**29** : Luteoline



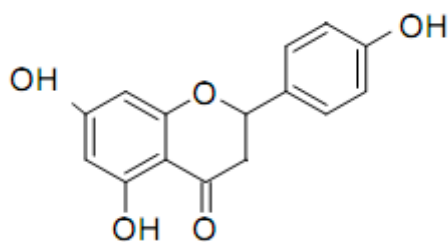
**28** :Luteoline-7-O-glucoside



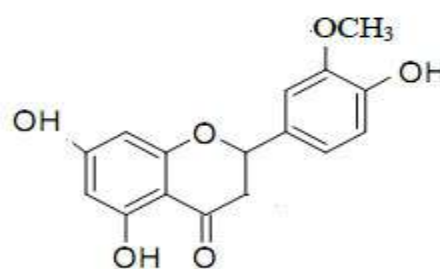
**40** : isorientine



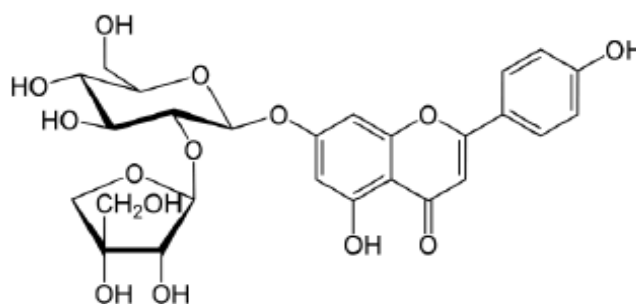
**50** :Orientine



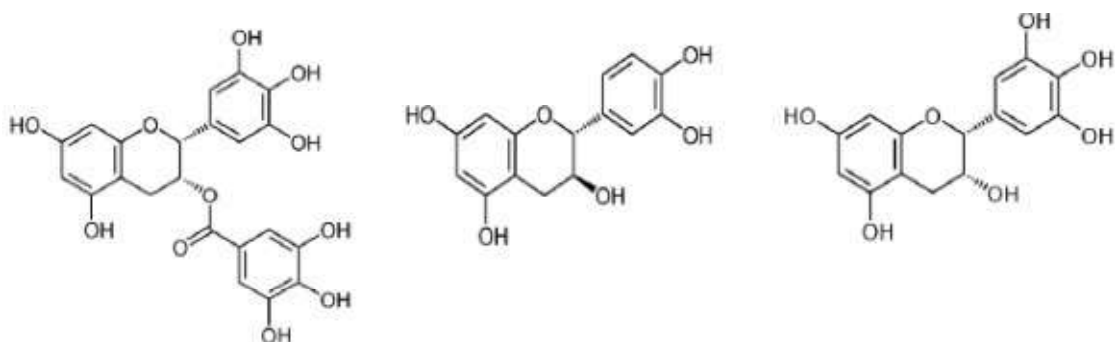
**13** :Naringenine



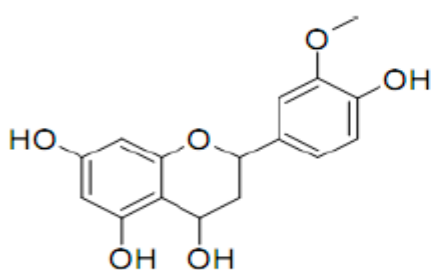
**14** : Homoeriodityol



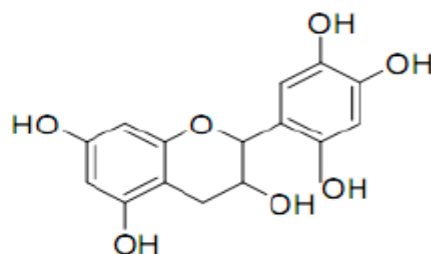
**30** : Apiine



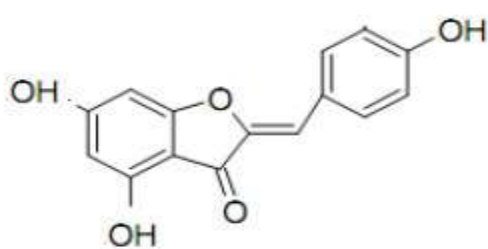
**22** :(-)-Epigallocatechine-3-O-gallate **23** : (-)-Epigallocatechine **24** : (+)-Gallocatechine



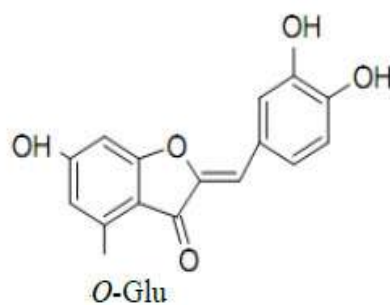
**25** :5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavan-4-ol



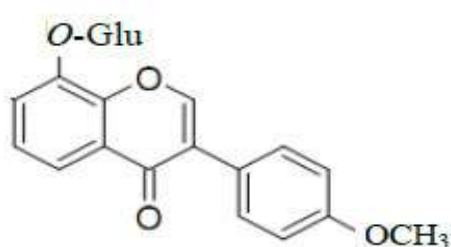
**26** : 3, 5, 7,3',4',6'-hexahydroxyflavane



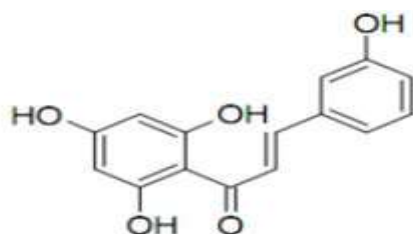
**35** :Cernuoside



**36** :Aureusin



**47** :glucopyranoside isoflavone

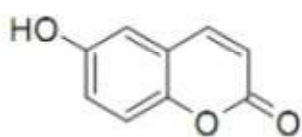


**38** : 3, 4,2',4',6'-penta-hydroxy-chalcone

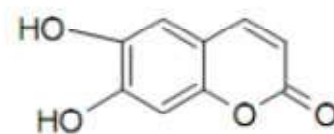
**Figure 1.2** : Structures de quelques flavonoïde isolé à partir des Plumbaginaceae

## 1.6.2 Coumarines

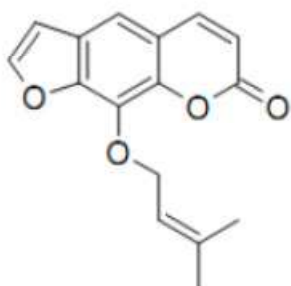
Les coumarines sont une autre classe des métabolites secondaires qui ont aussi marqué leur présence dans les Plumbaginaceae et notamment dans les espèces *Limonium axillare* et *Plumbago zeylanica*, à partir du premier taxon ils furent isolés (LEFAHAL, 2014): Ombelliférone **54**, Aesculétine **55**, Impératorine **56**, Isoimpératorine **57**, Xanthotoxol **58**, Bergaptène **59** (AHMED *et al.*, 1999). Séséline **60**, 5-méthoxyséséline **61**, Xanthylétine **62**, Xanthoxylétine **63**, Subérosin **64** sont présent dans l'espèce *Plumbago zeylanica* (LIE-CHWEN *et al.*, 2003).



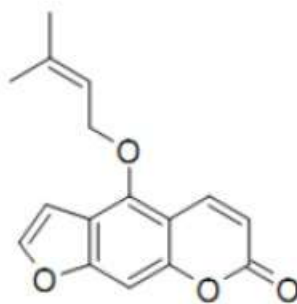
**54**: Ombelliférone



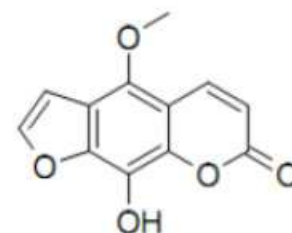
**55**: Aesculétine



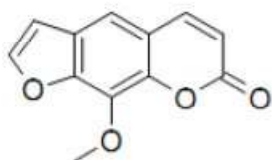
**56**: Impératorine



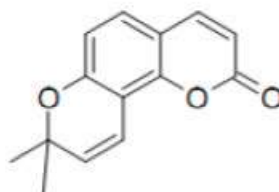
**57**: Isoimpératorine



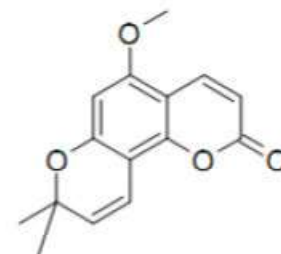
**58**: Xanthotoxol



**59**: Bergaptène

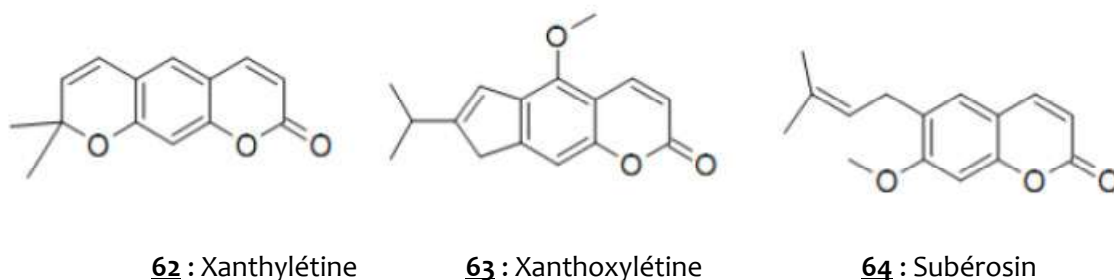


**60**: Séséline



**61**: 5-méthoxy séséline





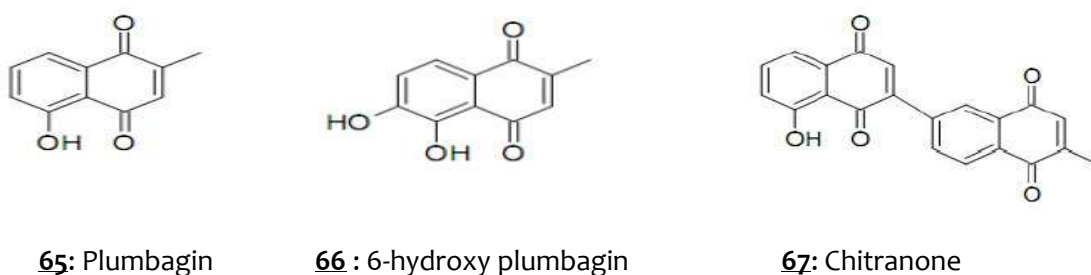
**Figure 1.3 :** Structures des coumarines isolées à partir des Plumbaginaceae.

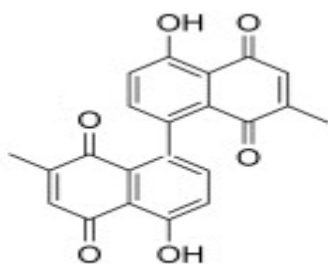
### 1.6.3 Naphtoquinones

Les naphtoquinones ce sont des composés d'origine naturelle, dont la majorité sont des pigments qui se retrouvent dans les cellules vacuoles de la plante, dissout sous forme glucosides. Les naphtoquinones sont des métabolites secondaires répandues dans la règne végétale, notamment dans les familles (Plumbaginaceae, Juglandaceae, Ebenaceae, Boraginaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae, Iridaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Avicenniaceae, Balsaminaceae, Bignoniaceae, Gentianaceae, Droseraceae, Nepenthaceae, Lythraceae, Euphorbiaceae) (ZAKARIA *et al.*, 1984 ; ZHONG *et al.*, 1984 ; BINDER & FLATH *et al.*, 1989 ; DINDA *et al.*, 1998), ainsi dans la règne animale comme étant les champignons et les microorganismes (Streptomyces, Fusarium) (MOORE & HOPKE, 2001).

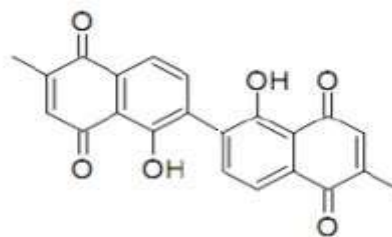
Les études phytochimiques menées sur le genre *Plumbago* (Plumbaginaceae) ont permet d'isoler la plumbagin 65 à partir des racines de l'espèce *Plumbago zeylanica* (JEYACHANDRAN *et al.*, 2009), et celles de *Plumbago scandens* (DE PAIVA *et al.*, 2004).

À partir des parties aériennes de *Plumbago indica* a été isolé le 6-hydroxy plumbagin (5,6-dihydroxy-2-méthyl-1,4-naphtoquinone) 66 (DINDA *et al.*, 1992). Babula et ces collaborateurs on met en évidence la présence des binaphtoquinones dans l'espèce *Plumbago zeylanica* comme étant le chitranone 67, le maritinone 68, et l'elliptinone 69 (BABULA *et al.*, 2009).





68 : Maritinone



69 :Elliptinone

**Figure 1.4** : Structures des naphthoquinones isolées à partir des Plumbaginaceae.

### 1.6.4 Huiles essentielles

La composition d'huile essentielle isolée à partir des parties aériennes de *Limonium echioides* a mise en évidence la présence de 65 composants dont 5 sont majoritaires : hexacosane (10.7%), acide palmitique (9.76%), nonacosane (8.44%), (E, E)-farnesyl acétate (7%), et la vanilline (6.51%) (SAIDANA *et al.*, 2008).

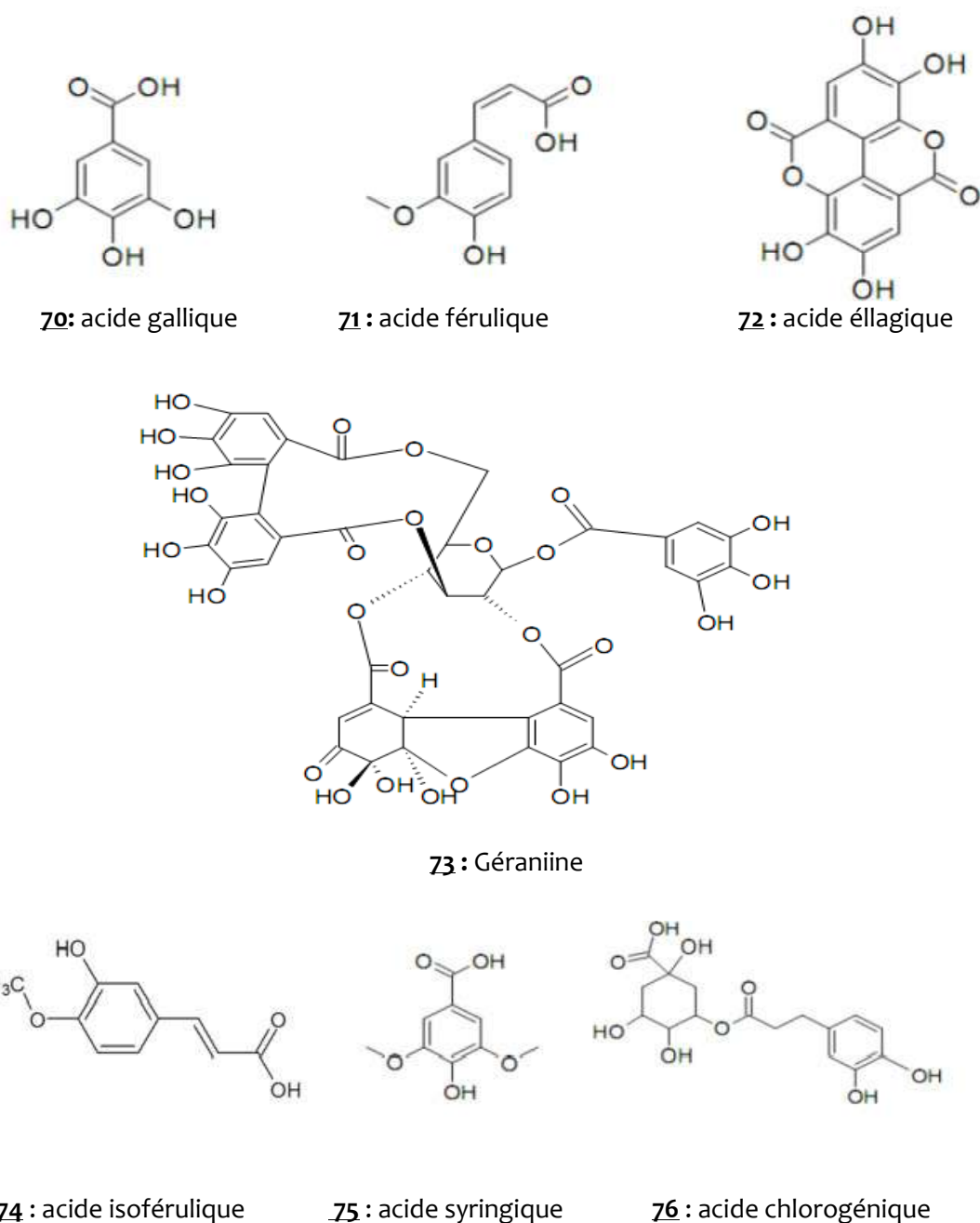
Les analyses chimiques menées sur l'huile essentielle isolée à partir des différents organes (racines, feuilles, fleurs, graines) de la plante *Limonium guyanicum* (pousse en Tunisie) montrent que l'huile des racines et celle des feuilles est constituée de monoterpènes avec les pourcentages respectifs de 22.56%, 26,21% (HAMMAMI *et al.*, 2011).

### 1.6.5 Divers

Les études phytochimiques menées sur différentes genres de Plumbaginaceae révèlent la présence des acides phénoliques comme le montre le tableau 1.2 .

**Tableau 1.2** : Acides phénoliques isolés à partir des Plumbaginaceae ( LEFAHAL ,2014).

Composé	Espèce	Référence
acide gallique 70	<i>Limonium feei</i> <i>Limonium brasiliense</i> <i>Limonium gmelinii</i> <i>Limonium popovii</i>	(CHAABI <i>et al.</i> , 2008). (MURRAY <i>et al.</i> , 2004). (KORUL KINA <i>et al.</i> , 2004).
acide férulique 71 acide ellagique 72 géraniine 73 acide isoférulique 74	<i>Limonium axillare</i>	(AHMED <i>et al.</i> , 1999)  (BACHIR <i>et al.</i> , 1994)
acide ellagique 72 acide syringique 75	<i>Limonium gmelinii</i>	(KORUL KINA <i>et al.</i> , 2004)
acide chlorogénique 76	<i>Plumbago scandens</i> <i>Plumbago auriculata</i>	(DE PAIVA <i>et al.</i> , 2002)



**Figure 1.5 :** Structures des acides phénoliques isolées à partir des Plumbaginaceae.

### 1.7 Genre *Limoniastrum* Moench

Le genre *Limoniastrum* Moench contient six espèces en tout ; les quatre espèces sont des endémique saharo maghrébines dont l'une est situé sur la côte atlantique du Maroc (*L. weygandiorum*) et d'autres continental subsaharienne (*L. fei*, *L. Guyonianum*, *L. ifniens*); une cinquieme, *L. monopetalum* est circumméditerranéenne ; la sixieme, *L. migiurtinum*, habite les régions riveraines de la Mer Rouge (OZENDA, 2004).

### 1.7.1 Caractères généraux du genre *Limoniastrum* Moench

Les plantes du genre *Limoniastrum* Moench sont des plantes vivaces, à feuille entières ou à peine dentées, grisâtres, charmues et un peu coriaces, portant des concrétions calcaires ; fleurs roses ou pourpres (OZENDA, 2004).

### 1.7.2 L'espèce *Limoniastrum feei* (De Gir.) Batt.

Il s'agit d'une espèce dite saharo-arabique stricte (MSANDA *et al.*, 2002), qui croît dans tout le Sahara septentrionale algérien et marocain (OZENDA, 2004). Il s'agit d'un arbuste bas, de 10 à 40 cm, à feuilles plus longues et plates serrés en rosettes au sommet des rameaux ; sa hampe florifère sans feuilles, se termine par des inflorescences courtes, très fragiles, à fleurs entourées de bractées coriaces épineuses et d'un rouge violacé (OZENDA, 2004). Cette espèce xérophyte est réputée pour sa forte résistance aux conditions climatiques extrêmes. C'est une plante grasse qui sécrète des sels (STOCKER *et al.*, 1974).



**Figure 1.6 :** Aspect Morphologique de l'espèce *Limoniastrum feei*  
photo(A) (Ozenda, 2004) ; photo(B) : [http://plantsofsouthernmorocco.biota-africa.net/plantdata\\_sub.php?Mspec\\_ID=437&PHPSESSID=2t2ihksvqo161i1c6t99crki85](http://plantsofsouthernmorocco.biota-africa.net/plantdata_sub.php?Mspec_ID=437&PHPSESSID=2t2ihksvqo161i1c6t99crki85)

### 1.7.3 Dénomination et synonyme

Les synonymes de l'espèce *Limoniastrum Feei* (De Gir.) Batt: *Bubania Feei* De Girard, *Ceratolimon feei* (Girard) (BELLAKHDAR, 1997 ; CHERITI, 2000). nom vernaculaire melfet khadem (ملفت الخادم).

### 1.7.4 Classification

D'après Quézel et Santa (1963); Guignard et Dupont (2007), la classification qu'occupe *L. feei* est la suivante :

Classification botanique	
Embranchement :	Spermaphytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Caryophyllidées
Ordre :	Plumbaginales
Famille :	Plumbaginacées
Genre :	<i>Limoniastrum</i>
Espèce :	<i>Limoniastrum feei</i> (Girard) Batt.

### 1.7.5 Ethnopharmacologie

Dans quelques régions en Algérie, notamment dans la région sud-ouest, *L. feei* est utilisée dans le traitement des personnes qui ont eu des piqueurs de scorpions (témoignage au cours de la récolte de la plante). Son usage le plus fréquent par les populations indigènes est le traitement des infections gastriques et pulmonaires (BELBOUKHARI & CHERITI, 2005, 2009).

### 1.7.6 Travaux antérieurs

*L. feei* a fait l'objet de quelques études rapportées dans la littérature. Nous citerons celle faite par Belboukhari et Cheriti (2005), qui rapporte que cette espèce possède un pouvoir antimicrobien important vis-à-vis d'*Escherichia coli* et un pouvoir antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*. Les mêmes auteurs ont contribué à l'étude de la caractérisation des flavonoïdes extraits à partir des tiges de . Ils ont identifié quatre flavonoïdes qui sont : 6,3',4'-tri-methoxy 3,5,5'-trihydroxyflavonol (1), 3-(6''-malonyl 2''ramnosyl glucosil) 6,3',4'-tri-methoxy 5,5'-dihydroxyflavonol (2), tétra-acétate 7-

dihydroxy-4'-methoxy 8-O- $\beta$ -glucopyranoside isoflavone (3) et tétra-acétate 7,4'-dimethoxy 8-O- $\beta$ -glucopyranoside isoflavone (4) (BELBOUKHARI & CHERITI, 2007).

Les travaux effectués par Chaabi *et al.* (2008) ont conduit à l'identification de sept composés phénoliques qui sont: acide gallique, myrciaphenone A, myricétin-3-O- $\beta$ -galactopyranoside, epigallocatechine-3-O-gallate, myricétine 3-O- $\beta$ -rhamnopyranoside, quercétine et myricétine. Les mêmes auteurs ont évalué l'activité antioxydante de chaque composé isolé. L'acide gallique a présenté l'activité antioxydante la plus élevée. Dans une autre étude, deux molécules de la famille des saponosides ont été extraites et identifiées par Belboukhari et Cheriti (2009), à partir des tiges de *L. feei*, il s'agit de : 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxy-30-acetylolean-12-ène et de 1-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1)-6-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,22 $\xi$ -26-tetrahydroxyfurost-5(6)-ène-26-O- $\beta$ -D-glucopyranoside.

## 1.8 Conclusion

La synthèse de toutes les données bibliographiques concernant la famille plombaginacées et le genre *Limoniastrum Feei* nous encourage à réaliser une étude phytochimique approfondie de l'espèce endémique choisie *Limoniastrum Feei*.



*Chapitre 2*  
*Antioxydant*  
*et*  
*Anti-inflammatoire*



## CHAPITRE 2

### ANTI OXYDANT ET ANTI INFLAMMATOIRE

#### 2.1 Antioxydant

Les études épidémiologiques montrent un lien étroit entre la consommation des fruits et légumes et la réduction du risque de maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires causées par le stress oxydatif (**SHAHID 1997 ; BIGLARI et al., 2008; JVANMARDI et al.,2003; CHAOVANALIKIT et al., 2004**).

L'intérêt des antioxydants est sans cesse croissant du fait de leur grande capacité à réprimer les radicaux libres (**SILVA et al., 2007**). Le premier congrès sur les méthodes antioxydantes tenu à Orlando, aux Etats-Unis (2004) a permis la validation de méthodes dites standards pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans les aliments, les plantes, les produits pharmaceutiques, nutraceutiques, et les suppléments diététiques (**SANCHEZ-MORENA ., 2002**).

Le stress oxydant (ou oxydatif) correspond a une surproduction dans l'organisme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces espèces peuvent être classées en deux catégorie :des molécules ,comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'acide hypochloreux (HOCl),et des radicaux libres tels que l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ) ,l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ),l'hydroxyle( $HO^{\cdot}$ ),les peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) et les alkoxydes ( $RO^{\cdot}$ ). Les radicaux peuvent réagir avec les autres molécules de différentes manières : en leur cédant un électron (radicaux réducteurs), en leurs retirant un électron (radicaux oxydants) ou en s'associant avec elles.

Dans les trois cas, la molécules non radicalaire devient un nouveau radicale et ce phénomène peut devenir le point de départ d'une réaction en chaine. Les ERO ne sont pas toutes aussi réactives et dangereuse . Les  $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$  sont peut réactives, tandis que le radical hydroxyle  $HO^{\cdot}$  est la plus réactives de toutes (**NOGUCHI et al.,2000**)

Les ERO sont essentielles au fonctionnement de l'organisme, mais sont présentes en faible quantité. Par exemple, dans le système immunitaire humain, les phagocytes une catégorie de globules blanc – éliminent les souches bactériennes qu'il engloutissent en produisant des ERO :  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$  et HOCl. En revanche, une quantité trop importante d'ERO (stress oxydant) peut avoir des effets néfastes. En effet ,le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ )



peut endommager rapidement des biomolécules telles que l'ADN, les lipides, les glucides et les protéines. Les conséquences sont multiples : accélération du vieillissement cellulaire, développement de cancer ou de maladies cardiovasculaires, entre autres. L'organisme doit alors diminuer toute surproduction d'ERO en utilisant des antioxydants (CHAREF, 2010).

L'organisme produit ses propres antioxydants comme la vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol) et certaines enzymes ; on parle d'antioxydants endogènes. Il existe, par exemple, deux enzymes (la super oxyde dismutase et la catalase) dont l'action successive aboutit à l'élimination de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). La première catalyse la transformation d' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , puis la seconde catalyse la transformation  $H_2O_2$  en eau et en oxygène. Ces enzymes permettent donc de neutraliser les ERO  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$  (KINSELLA *et al.*, 2005).

### 2.1.1 Définition

Selon le « Webster's third New International Dictionary » (MERRIAM-WEBSTER, 2002), un antioxydant est une substance qui s'oppose à l'oxydation ou empêche des réactions favorisées par l'oxygène ou des peroxydes. Plusieurs de ces substances sont employées en préventif dans divers produits notamment dans les corps gras, les produits alimentaires et les savons pour retarder la rancidité oxydative et dans les produits pétroliers pour retarder la formation des gommages et autres modifications indésirables et dans le caoutchouc pour retarder le vieillissement. En médecine et en biochimie, les antioxydants sont des enzymes ou d'autres substances organiques telles que la vitamine E ou bêta-carotène qui sont capables d'éliminer les effets préjudiciables de l'oxydation chez les tissus animaux (HUANG, *et al.*, 2005). Dans l'industrie chimique, les antioxydants constituent des composés qui retardent l'autoxydation d'un produit chimique tel le caoutchouc et le plastique. Les antioxydants efficaces sont des extracteurs radicaux qui décomposent des réactions en chaînes des radicaux. Des phénols et des amines sont employés souvent comme antioxydants dans ces industries. En science alimentaire, un antioxydant est une substance contenue dans des aliments qui diminue considérablement les effets adverses des espèces réactives (espèces réactives de l'oxygène et de l'azote) sur les fonctions physiologiques normales de l'homme. HALLIWELL définit les antioxydants biologiques comme étant des molécules qui à très faibles doses comparées aux molécules qu'ils sont supposés protéger, peuvent prévenir ou réduire l'extension de la destruction par oxydation (HALLIWELL *et al.*, 1990).

## **2.1.2 Les systèmes de protection contre le stress oxydant (les antioxydants)**

### **2.1.2.1 Définition**

désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (DIALLO, 2005).

### **2.1.2.2 Mécanismes d'action des antioxydants**

Un antioxydant est dit primaire ou vrai, quand il réagit avec des radicaux lipidiques et les transforme en produits plus stables, interrompant ainsi la chaîne de propagation oxydative. Ce type d'antioxydant constitue la catégorie principale et la plus décrite dans la littérature. Les principaux antioxydants primaires sont de nature phénolique. Il est secondaire ou préventif, qui diminue la vitesse d'initiation par autres mécanismes, par exemple en chélatant les métaux, en piégeant l'oxygène ou en absorbant les radiations UV. Par ailleurs, il existe des substances qui peuvent agir en synergie avec les antioxydants que nous venons de définir. Ceux-ci, sont appelés antioxydants synergistes et possèdent des mécanismes d'action qui leur sont propres (GORDON, 1990).

## **2.1.3 Principaux antioxydants**

### **2.1.3.1 Antioxydants endogènes**

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (PINCEMAIL, 2002).

### 2.1.3.2 Antioxydants exogènes

#### a) Antioxydants synthétiques

Cette famille de substances antioxydants est relativement limitée, puisqu'elle correspond à des corps étrangers au milieu biologique (humain comme animal), donc biochimiquement suspects. C'est la raison pour laquelle ces molécules ont fait l'objet de nombreuses publications, dont les données toxicologiques sont parfois contradictoires (CHAREF, 2010).

Les principaux antioxydants synthétiques autorisés dans l'industrie alimentaire sont :

- Le Butylhydroxytoluène ou B.H.T. (E 321)
- Le Butylhydroxyanisole ou B.H.A. (E 320)
- L'acide isoascorbique (ou erthorbique) (E 315)

#### b) Antioxydants naturels

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydants remarquables (tableau 2.1). La recherche d'antioxydants naturels se fait en deux étapes : la première consiste à trouver dans une plante une activité antioxydant et la seconde à identifier les composants antioxydants responsables de cette activité.

- **Les caroténoïdes** : sont capables d'inactiver des radicaux libres. D'après Burton et Ingold (1984), le caroténoïde est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes (MILANE, 2004).

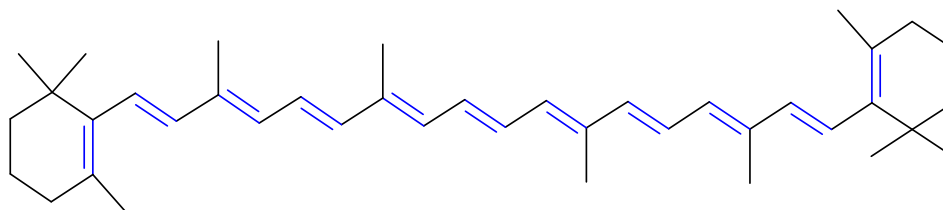


Figure 2.1 Structure des caroténoïdes

- **La vitamine E ou l'α-tocophérol** : cette vitamine réagit avec les radicaux oxygénés lipidique en empêchant leur propagation (LIEBLER *et al*, 1986). Également est un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux.

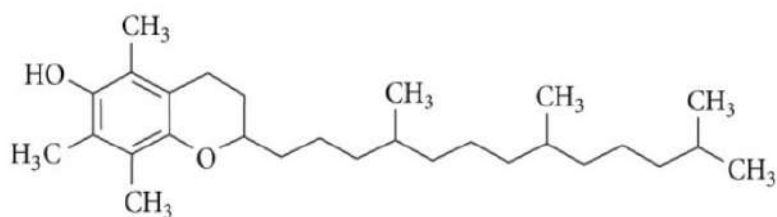


Figure 2.2 Structure moléculaire de  $\alpha$ -tocophérols

- **La vitamine C ou l'acide L-ascorbique** : cette vitamine joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E, il peut capter à la fois les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (LII *et al*, 1988).

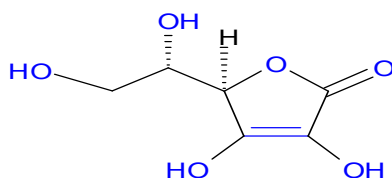


Figure 2.3 Structure de l'acide ascorbique

- **Les composés phénoliques** : forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (MOHAMMEDI, 2006). La principale classe représente les flavonoïdes qui peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant par capture directe des ROS.

**Tableau 2.1** Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes (MOON & SHIBAMOTO, 2009).

Nom scientifique	Nom commun	Composés actifs
Glycyrrhiza glabra	Réglisse	glycyrrhizine
Zingiber officinalis	Gingembre	6 - gingerdiols
Solanum lycopersicum	Tomates	rutine, acide ascorbique, acide chlorogénique,
Glycine max	Soja	eugenol, maltol, alcool benzyle
Thymus vulgaris	Thyme	thymol, carvacrol, terpinène
Rosmarinus officinalis	Romarin	acide carnosolique
Zanthoxylum piperitum	Poivre noir	arbutine, magnoflorine
Eucalyptus globulus	Eucalyptus	1,8-cineole, benzaldéhyde
Syzygium aromaticum	Giroflier	eugenol, eugenyl acétate
Vitis vinifera	Raisin	Composés phénoliques

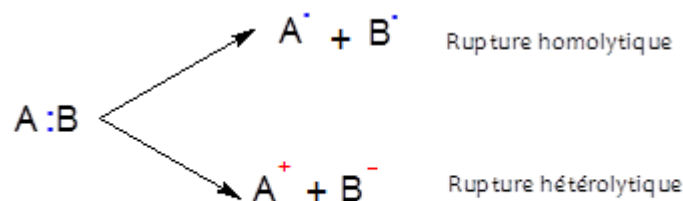
### 2.1.4. Les flavonoïdes comme antioxydants

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant (PETERSON, 1998 ; CARLO, 1999 ; COTTELLE , 2001) , à titre d'exemple : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ROS.

### 2.1.5. Les radicaux libres

#### 2.1.5.1. Définition

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, des espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant : (BONNEFONT *et al.*, 2003).



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (BONNEFONT *et al.*, 2003).

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant électron ou en prenant un à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano à la milliseconde) (KOLECHLIN, 2006).

### 2.1.5.2 Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (ex : hydroperoxydes ROOH et peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (WALL, 2000) tableau 2.2 .

**Tableau 2.2** : Quelques espèces réactives de l'oxygène

ROS (Reactive Oxygen Species )	Symbole
Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Radical hydroxyle	OH <sup>•</sup>
Radical hydroperoxyde	HOO <sup>•</sup>
Radical peroxyde	ROO <sup>•</sup>
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO <sup>•</sup>
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Radical oxyde nitrique	NO <sup>•</sup>

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité est très variable selon la nature du radical oxydant (FAVIER , 2003).  
OH<sup>•</sup>>RO<sup>•</sup>>HOO<sup>•</sup>>ROO<sup>•</sup>>NO<sup>•</sup>

### 2.1.5.3 Mécanisme d'action des radicaux libres

On assimile trop souvent et de façon caricaturale les radicaux libres à des agresseurs à l'origine de nombreuses détériorations.

- Les radicaux libres entrent en contact avec les phospholipides membranaires.
- La membrane se fragilise et se désintègre.
- Le contenu de la cellule se répand dans le milieu extracellulaire.
- La cellule perd sa forme et sa fonction initiale.
- La cellule meurt, ce qui fragilise le tissu entier et lorsqu'elle ne meurt pas, les pores formés dans la membrane plasmique favorisent l'entrée de substances toxiques, responsables de son dysfonctionnement (LAURENCE, 2002).

## 2.1.6 Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologique (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (FAVIER, 2003) :

### 2.1.6.1 Protéines et acides aminés

L'oxydation des protéines aboutit à la fragmentation et formation de liaisons croisées (donne naissance à des composés carbonylés : R-CHO, R-CO-R, R-CO-CO-R) L'oxydation des enzymes provoque la perturbation du métabolisme.

### 2.1.6.2 Lipides

Les membranes (plasmique ou intracellulaires) et les lipoprotéines contiennent des phospholipides riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) susceptibles de subir une peroxydation ce qui induit la formation de nombreux dérivés.

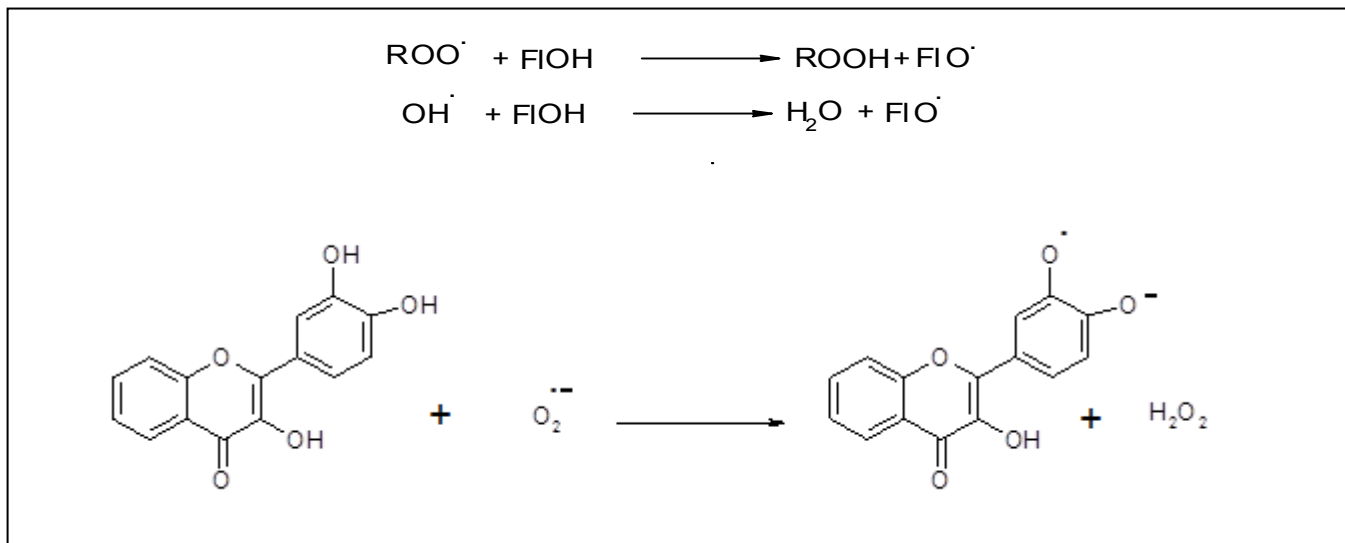
### 2.1.6.3 Acides nucléiques

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des être vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (FAVIER, 2003). Les ROS produits par les mitochondries causent des dégâts sur l'ADN mitochondrial (mutations ponctuelles) c'est-à-dire des perturbations dans le fonctionnement de la mitochondrie (MYARA, 2002).

En effet, cette modification de l'ADN induit des mutations souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ces sont les premières étapes de la carcinogenèse (FAVIER, 2003, CADET *et al.*, 2002).

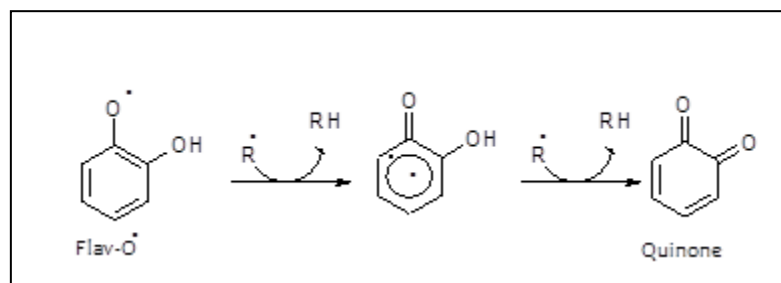
## 2.1.7 Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (JAVANOVIC *et al.*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ( $R^\bullet$ ) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le  $OH^\bullet$  par transfert d'hydrogène.



**Figure 2. 4** Réaction des flavonoïdes avec les espèces oxygénées réactives (DENSIOV & AFANAS'EV, 2005). avec FIOH : flavonoïde, FIO<sup>•</sup> : flavonoïde sous forme radicalaire.

Le radical flavonoxy (FI-O<sup>•</sup>) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (MCCORD, 1995).

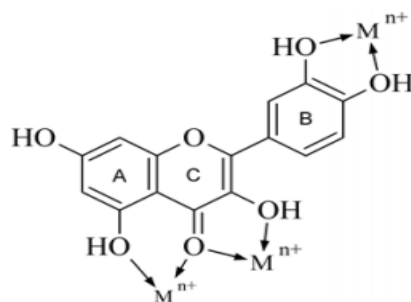


**Figure 2.5** Réaction des flavonoxy avec les EOR

### 2.1.8 Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe<sup>+2</sup>) et du cuivre (Cu<sup>n+</sup>) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle. Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (MORRIS, 1995 ; BROWN, 1998).





**Figure 2.6** Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques

### 2.1.9 Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables à l'inhibition de très nombreuses enzymes ; parmi les quelles les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant (gluthathione S-transférase, les lipoxgénases, la xanthine oxydase, et les nitrique oxydesynthases) et les enzymes digestives (comme la trypsine, l' $\alpha$ -amylase et la lipase) (SEBASTIEN, 2006).

#### 2.1.10 Evaluation de l'activité antioxydant

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plus part de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Alors, la mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels. Le premier mode, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. Par contre, le second relie la quantité des radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé (CHAREF, 2010).

#### 2.1.11 Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres

La capacité du produit à piéger les radicaux libres est donc à ralentir ou inhiber, aussi bien les phases d'initiation que de propagation. Parmi les méthodes d'évaluation du pouvoir anti radicalaire, sont qui emploient azo-composant pour produire des radicaux stables sans l'intervention d'un produit de dégradation. En effet, elles mesurent directement la réactivité d'un composé donneur de  $H\cdot$  comparativement à celle d'un antioxydant de référence, D'autres méthodes sont également utilisées, comme la méthode utilisant le radical stable DPPH $\cdot$  (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle). De plus, il y a d'autres techniques

spectroscopiques qui utilisent les dérivées oxygénées pour évaluer le statut antioxydant des extraits ou des composés purs comme le balayage des radicaux nitroxydes, hydroxyles, pyroxyles et su peroxydes (CHAREF, 2010).

## 2.2 l'inflammatoire

### 2.2.1 Définition

Ensemble des modifications vasculaires, tissulaires et humorales produites chez les êtres pluricellulaires par toute atteinte à leur intégrité tissulaire (FRANCESCHINI P, 1994).

Le déclenchement et le déroulement de l'inflammation sont gouvernés par des réflexes nerveux et surtout par des médiateurs chimiques endogènes : amines et peptides vasoactifs (histamine, sérotonine, slow reacting factor), kinine, prostaglandines (FRANCESCHINI P, 1994). C'est un processus de défense de l'organisme qui parfois évolue de façon anormale et déclenche des maladies auxquelles on oppose des médicaments dits anti-inflammatoires ; soit stéroïdiens (AIS, type la cortisone) soit non stéroïdiens (AINS, type l'indométacine) (GARNIER et col., 2002).

### 2.2.2 L'inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (CHARLES et al., 2010).

### 2.2.3 L'inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la béryllose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses

inflammatoires. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules

d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (CHARLES *et al.*, 2010). Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorisent l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (NOURSHARGH *et al.*, 2006; CHARLES *et al.*, 2010).

#### 2.2.4 Réaction inflammatoire

C'est une réaction locale provoquée par différents agents physiques, chimiques ou bactériens ; les signes cliniques sont : rougeur, douleur, chaleur et tuméfaction (œdème). Cette réaction inflammatoire met en œuvre des processus immunologiques et des réactions en cascade destinées à mobiliser les cellules capable de défendre l'organisme vis-à-vis d'une agression (bactéries) et à repérer les dégâts (cicatrisation).

La réaction inflammatoire, qui est une exacerbation de mécanismes physiologiques, à des stimuli phlogogènes fait intervenir différents facteurs cellulaires et vasculaires mis en jeu à la suite de la lésion cellulaire primitive.

La bradykinine, la réaction du complément, l'afflux des mastocytes qui libèrent de l'histamine et du pafacether, la voie de l'acide arachidonique qui produit des prostaglandines (voie lipooxygénase) et des leucotriènes (voie cyclooxygénase), et l'implication des cellules de l'immunité (macrophages, neutrophiles...) favorisent tous la réaction inflammatoire aiguë.

Dans un deuxième temps, la phagocytose des débris cellulaires toxiques peut conduire, après mort des polynucléaires et des macrophages, à une chronicité de l'inflammation par libération du contenu lysosomal particulièrement agressif.

## 2.2.5 Pathologies inflammatoires

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires, à savoir les maladies auto-immunes systémiques et localisées, les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé notamment, des affections iatrogènes ou paranéoplasiques dont le mécanisme n'est pas auto-immun (CHARLES *et al.*, 2010). Quelques exemples sont rapportés dans le tableau (2.3).

**Tableau 2.3** Exemples de maladies liées à l'inflammation (NATHAN, 2002).

<b>Désordres dans les quelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation</b>	
Asthme	Polyarthrite rhumatoïde
Artériosclérose	Arthrose
Goutte	Thyroïdite d'Hashimoto
Maladie d'Alzheimer	Lupus érythémateux disséminé
Eczéma	Maladie de Crohn
<b>Maladies d'origine infectieux dans laquelle l'inflammation contribue dans la pathologie</b>	
Hépatite C	Tuberculose
Tuberculose	Dysenterie bactérienne
<b>Maladies d'origines divers dans les quelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale de la pathologie</b>	
Fibrose pulmonaire idiopathique	Bilharziose
Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique	

## 2.2.6 Anti-inflammatoires

### 2.2.6.1 Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sont sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la

production des prostaglandines (notamment la PGE<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub>), importants médiateurs de l'inflammation (Figure 2.7). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines (NICOLAS *et al.*, 2001). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (BLAIN *et al.*, 2000).

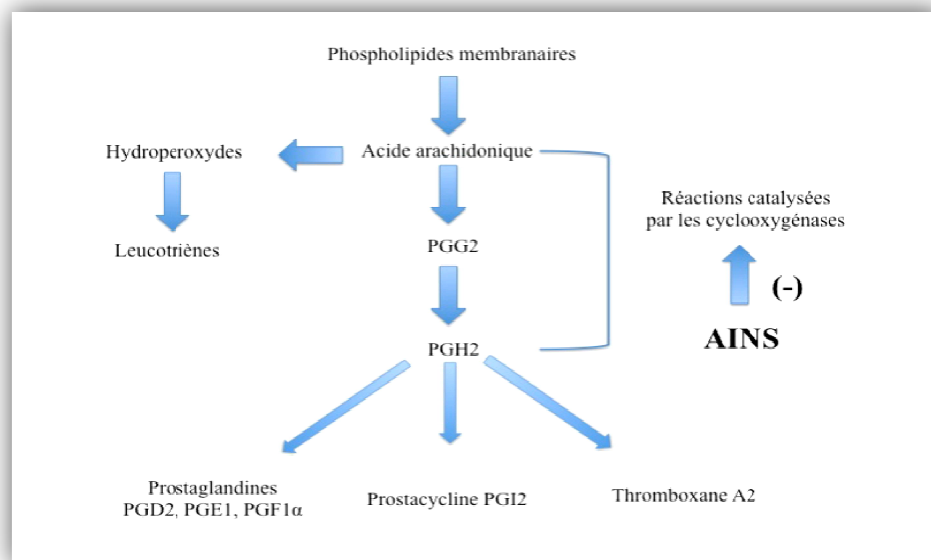


Figure 2.7 mécanisme d'action des AINS (NICOLAS, 2001).

### 2.2.6.2 Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes

(GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes (Figure 2.8).

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (BARNES, 1998). Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire (HENZEN, 2003).

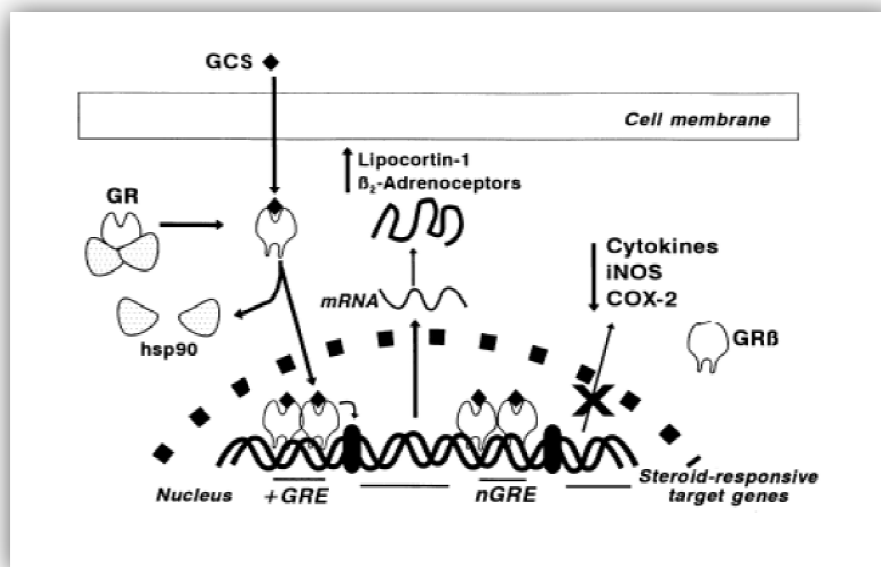


Figure 2.8 Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (BARNES, 1998).

### 2 .2.6.3 Méthodes de tests anti-inflammatoires

- Test de perméabilisation capillaire, en général chez la souris, à l'histamine, la sérotonine, sérotonine-urée, ovalbumin . Ils mettent en jeu l'un ou l'autre des nombreux médiateurs de l'inflammation de manière prépondérante.
- Test d'œdème plantaire chez le rat ou la souris par raison économique, lus par pletysmométrie ou mesure métrique. Là aussi, les agents phlobogènes ont proliféré : levure de bière, carragénine, ovalbumine, dextran, formol ...Chacun de ces agents phlobogènes aurait pour avantage de mettre en jeu de façon préférentielle, un des mécanismes causals de l'œdème. Sur cette hypothèse de médiateurs différents, ces variantes du même test servent à mettre en évidence des différences de profil entre les molécules triées ; la valeur prédictive de tel microphénomène reste faible.
- Test de granulomes multiples et variés dont la principale difficulté est d'éliminer la pathologie septique souvent créée par ce type de manipulation : on a ainsi fait des « pellets » de coton, cellulose.
- Test de l'inflammation aïgue .Œdème nistatine (**SCHIATTI ET COL., 1970**) Injection de 0,1 ml d'une suspension de nistatine 8,5% dans la patte du rat. Six heures après, les animaux sont traités avec le produit. L'évaluation d'œdème se fait à 4, 6, 8, 10, 12, 24 et 48 H après l'injection de nistatine.
- Test Dual-activité anti-inflammatoire et gastrique Les rats sont traités par voie orale avec le produit, un contrôle et produit de référence. Après, ils sont maintenus pendant 45 mn dans une chambre froide (- 15°C) dans des cages indépendantes.
- Injection de la carragénine-patte , mesure de la patte 90 min après. Examen gastrique et quantitatif des lésions (**RANSFORD & WHITEHOUSE, 1977**).
- Œdème de l'oreille de souris à l'huile de croton (**DIENG, 1993**) . L'application de l'huile de croton sur l'oreille de la souris provoque un œdème dont on peut ralentir le développement par un traitement anti-inflammatoire. La méthode dérive de celle de Tonelli qui a travaillé sur les rats.
- Test d'inflammation chronique in-vivo (**MORHR et al., 1976**). Le test de l'arthrite par adjuvant consiste à administrer dans la patte du rat une suspension de Mycobacterium butyricum (adjuvant de Freund), les substances à administrées quotidiennement et l'effet anti-inflammatoire est évalué par le plethysmomètre tous les deux jours pendant 30 jours ou tous les jours pendant 14 jours et le 21<sup>ème</sup> jour.

Les tests de l'inflammation chronique ou granulaire sont réalisés en plaçant sous la peau des substances qui induisent un granulome (sur coton pellet ou croton oil).

#### 2.2.6.4 Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxigénase ainsi que par d'autres mécanismes. Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le tableau 2.4

**Tableau 2.4** Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires (BARNES, 1998).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Feuilles, Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis</i> R.	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum</i> L.	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	Oedèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. Malaria
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisannuelle	Douleurs rhumatismales,



## 2.3 Conclusion

On désigne généralement par antioxydant toute substance présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat. L'antioxydant diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Ils sont utilisés pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. Leurs effets proviennent de deux mécanismes. Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours.



*Chapitre 3*  
*Matériel et Méthodes*



## CHAPITRE 3

### MATERIEL ET METHODES

Dans cette deuxième partie, nous aborderons quelques aspects d'ordres techniques concernant l'extraction des flavonoïdes, le fractionnement, les différents dosages chimiques, l'analyse chromatographique et l'étude du pouvoir antioxydant et l'anti-inflammatoire des différentes fractions obtenues à partir de la plante sélectionnées: *Limoniastrum feei* L. Les différentes étapes seront développées et détaillées tout au long de cette partie.

#### 3.1 Matière végétale

##### 3.1.1 Identification des plantes

L'identification de l'espèce *Limoniastrum feei* (**figure 3.1**) a été faite en collaboration avec le laboratoire de phytochimie & synthèse organique (LPSO) de l'Université Tahri Mohamed Bechar (Algérie). L'échantillons de référence ont été déposés au niveau de l'herbier de laboratoire sous le (CA99/14) (CHERITI, 2000 ; CHERITI *et al*., 2004).

##### 3.1.2 Récolte de la plante

L'espèce sélectionnée a été collectée dans leur habitat naturel, dont la zone de récolte a été choisie du fait de leur richesse en espèce étudiée.

La récolte du *Limoniastrum feei* a été réalisée dans la région de Kenadza (Wilaya Béchar), (**Tableau 3. 1, Figure 3.2**) au mois de Mars 2012 . Les tiges et les feuilles ont été séparées et séchées dans un endroit sec et aéré.

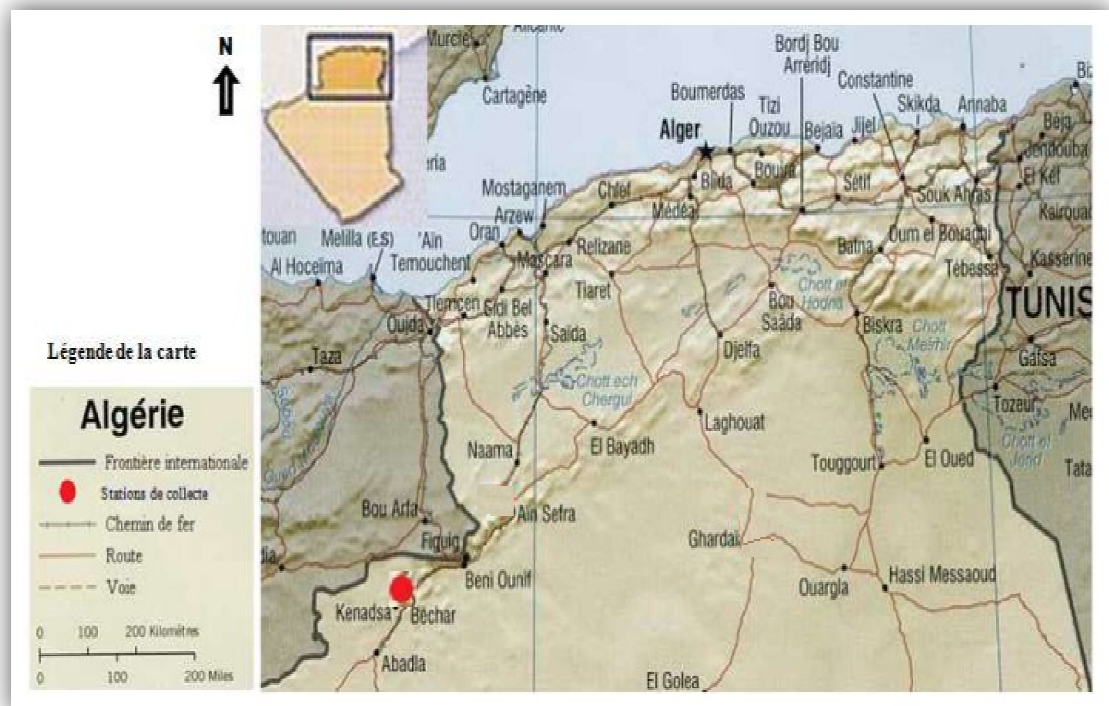


Figure 3.1 situation géographique des stations de collecte

Tableau 3.1 Paramètre géographique et bioclimatique des stations d'étude

Plante	Stations	Etage bioclimatique	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)
<i>L.feei</i>	Kenadsa (W.Béchar)	Aride, chaud	762	31° 33' 25.002 ''	2° 25' 24.03 ''

## 3.2 Préparation des extraits

### 3.2.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été développées pour déterminer les composés phénoliques. Les procédures de préparation des échantillons pour l'analyse des composés phénoliques varient beaucoup en fonction de la nature des composés à analyser.

Celles-ci doivent tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels: la polarité, l'acidité des molécules, le nombre de groupements hydroxyles et de noyaux aromatiques.

Les méthodes de dosage les plus couramment décrites comprennent plusieurs étapes de préparation d'échantillons. Chacune d'elle a pour but d'augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage.

Malheureusement, les différentes étapes peuvent parfois introduire des interférences qui créent des artefacts, ce qui n'est pas sans conséquence sur la reproductibilité du dosage et nécessite de faire la moyenne de plusieurs essais.

Il est donc important de contrôler toute la préparation et d'évaluer l'influence de ces effets sur l'analyse des résultats. En général, les échantillons solides sont soumis à un broyage et à un tamisage, souvent précédés par une étape de séchage à l'air libre du matériel végétal à analyser. Les échantillons liquides sont centrifugés et filtrés.

### 3.2.2 Préparation des extraits bruts par Extraction Solide-Liquide (ESL)

Dans cette partie de travail, nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques. Une quantité de 100 g de poudre végétale est mise en contact avec le solvant d'extraction qui a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés. Deux solvants ont ainsi été testés : l'acétone aqueux avec de proportion de 70% (v/v) (YU & DAHLGREN, 2000) et l'eau chaude (decoction) pour se rapprocher des préparations traditionnelles. Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums solides : liquides, les plus souvent trouvés dans la littérature, sont généralement situés entre 1/10 et 1/50 (mg/ml) (MICHEL, 2011). On a choisi le ratio 1/10 (mg/ml) dans la présente étude.

L'extraction sous reflux a été renouvelée trois fois toutes les 2h. Les extraits ont

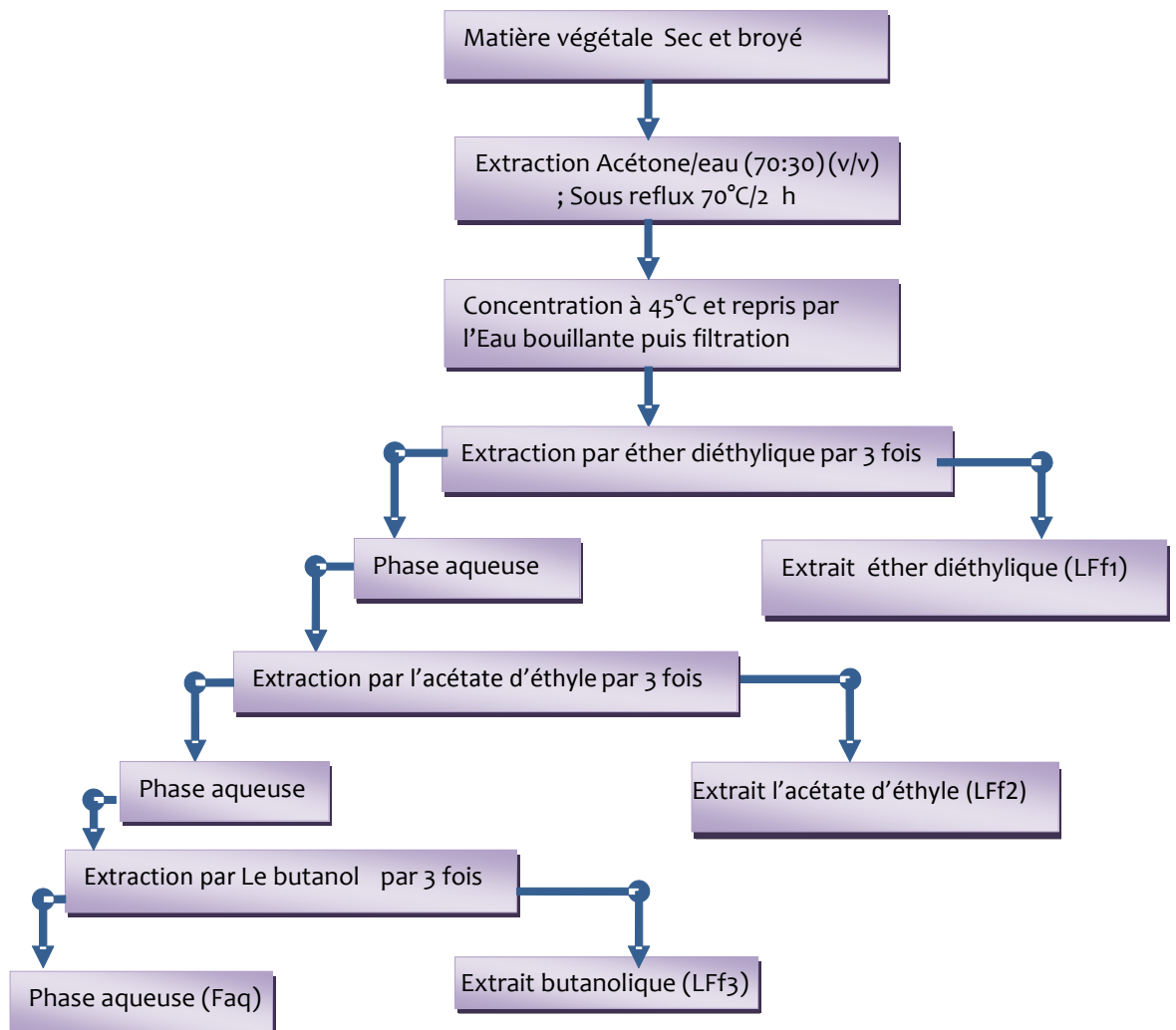
été filtrés par la suite et évaporés à sec sous pression réduite. lyophilisé. Nous avons obtenu une poudre floconneuse de couleur marron. Le rendement d'extraction a été calculé par rapport au poids total de la poudre végétale.

### 3.2.3 Fractionnement de l'extrait hydro-acétonique par Extraction Liquide-liquide (ELL)

Le fractionnement de l'extrait brut hydro-acétonique s'effectue selon la méthode de **MARKHAM (1982)** en utilisant une série de solvants à polarité croissante. Cette méthode, résumée dans la figure 3.2, comprend deux grandes étapes : la première étape d'extraction se fait avec l'acétone aqueux (70%) pour solubiliser les composés phénoliques et la deuxième étape consiste en un affrontement liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante, à savoir : l'extrait brut est repris par l'eau bouillante, une décantation pendant une nuit pour éliminer la chlorophylle. Le filtrat obtenue a été extraite trois fois successives par l'acétate d'éthyle, cela nous a permis d'obtenir la fraction du acétate d'éthyle. La phase aqueuse est reprise par le n-butanol, pour donner l'extrait butanolique La phase aqueuse est soumise à un autre fractionnement par l'éther éthylique. La solution aqueuse restante à la fin du partage à été utilisée comme fraction très polaire.

Les trois phases ont été concentrées au rotavapor, sous vide, à la température de 50°C puis lyophilisée. Le lyophilisat a permis d'obtenir une poudre floconneus. Tous les lyophilisats ont été conservés dans des flacons en verre et hermétiquement fermés.

La lyophilisation permet d'obtenir des produits finaux de haute qualité. La forme et l'aspect des produits sont bien conservés et leurs qualité aromatique est bien supérieure à celle des produits séchés, De plus, l'absence d'eau liquide dans le produit réduit considérablement le développement des réactions d'altération et permet la conservation des principes actifs dans le produit, qui peut alors être stocké à température proche de l'ambiante. Un autre avantage technologique majeur de lyophilisation repose sur la capacité du produit lyophilisé à se réhydrater instantanément.



**Figure 3.2** Schéma du fractionnement ELL adopté pour le partage en cinq extraits (LFf1,LFf2, LFf3 et Extrait aqueux) des extraits bruts hydro-acétonique

### 3.3 Séparation et Purification

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée en phase normale, dans la plupart des cas, avec un des supports suivants :

Plaque de gel de silice sur feuille d'aluminium (Merck) avec indice de fluorescence, dont les dimensions sont: 20 x 20 cm, épaisseur de la couche 0.1 mm.

Ces plaques constituent la phase stationnaire, elles ont été ensuite plongées dans des cuves conventionnelles en verre, remplies à environ 0.5 cm avec une phase mobile, qui est généralement un mélange binaire de solvants, selon le type de séparation recherchée.

Pour l'identification des flavonoïdes, nous avons réalisé des CCM avec deux différents systèmes d'élutions :

- **Système 1** : acétone/toluène/ acide formique (6 :8 :1, v/v/v) ( **HOSTETTMAN et al, 1998**)
- **Système 2** : acétate d'éthyl/ méthanol/ Eau distillée (10:1.5 :1, 10, v/v/v) (**MALES ET MEDIC-SARIC, 2001**).

l'analyse chromatographique sur couche mince CCM montre plusieurs taches, de différentes couleurs, à des Rf différents avec une trainée, surtout pour l'extrait chloroformique. Le développement des plaques CCM s'effectue dans l'éluant approprié. L'observation se fait sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation au sulfate de cérium et la vanille sulfurique.

Le profil CCM de ces extraits est presque identique notamment dans la partie relative aux composés flavonoidiques. La masse de l'extrait butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle étant supérieure à celle de l'extrait éther éthylique et sa richesse en composés de différentes natures nous a motivé à s'intéresser à l'investigation chimique de l'extrait butanolique et extrait d'acétate d'éthyle.

### 3.3.1. Purification des composés par chromatographie liquide sur colonne ouverte (CO)

Le premier fractionnement des extraits bruts ont été réalisés par chromatographie sur colonne ouverte en utilisant une phase stationnaire de Gel de silice 60, ASTM (SDS 9385), dimension des granules 40-63 µm (230-400 mesh) . La dimension de la colonne (hauteur et diamètre) a été choisie en fonction de la quantité de l'extrait à disposer.

Les systèmes d'élution utilisés ont été composés de différents gradients avec des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation.

Les deux extraits butanolique et acétate d'éthyle de l'extrait acétone des parties aériennes de *L.feei* ont été premièrement séparés sur colonne ouverte de gel de silice, avec élution Acétone /Toluène/ acide formique (60/80/10). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM, cela a permis de regrouper les fractions identiques vu la similarité de leur profil chromatographique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.1 (page 53).



### 3.3.2. Purification des composés par chromatographie liquide sur colonne par LC-UV

Les LC-UV sont réalisées sur une colonne de taille : 2 x 40 cm, remplie avec 150 g de gel de silice (Silicagel Ultrapure, 40-60  $\mu\text{m}$ ) . L'appareillage est composé d'un réservoir de phase mobile et d'une pompe Büchi 688 (pression max 40 bars). d'un détecteur UV multi-longueurs d'onde et d'un collecteur de fraction.

## 3.4 Purification des composés

Les noms de code des composés isolés sont du type LFX (pour *Limoniastrum feei*) , où X ne correspond pas à l'ordre de purification mais à celui de l'ordre d'apparition dans la partie concernant l'analyse structurale.

### 3.4.1 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des feuilles LFF1

L'Etude phytochimique de l'extrait d'éther d'éthyle des feuilles LFF1 Cet extrait a été l'un des premiers étudiés. 2.5 g de l'extrait LFF1 ont été fractionnés sur colonne (de (EtOAc/ MeOH/eau 10/1.5/1).) en utilisant la silice comme phase stationnaire permettant d'obtenir 24 fractions notées LFF1-1 à LFF1-24.

### 3.4.2 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des feuilles LFF2

L'extrait dichlorométhanique des feuilles, noté LFF2 (5g), a été préfractionné sur colonne de silice (EtOAc/ MeOH/eau 10/1.5/1).). Après analyse CCM, 10 fractions ont été obtenues, nommées LFF2-1 à LFF2-10.

### 3.4.3 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des feuilles LFF3

L'étude de cet extrait a été fractionnés sur colonne Le système éluant a été choisi par CCM dans le système (EtOAc/ MeOH/eau 10/1.5/1).). Après suivi par CCM 8 fractions ont été obtenues.

#### **3.4.4 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des tiges LFt1**

L'extrait éthyle des tiges de *Limoniastrum feei* (LFt1, 10 g) a été fractionné par LC-UV, en utilisant comme système de solvant, le système (EtOAc/ MeOH/eau 10/1.5/1). Après analyse des fractions par CCM, Dix fractions ont été obtenues .

#### **3.4.5 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des tiges LFt2**

Une séparation de L'extrait acétate d'éthyle LFt2 (4,2 g) sur gel de silice avec comme éluant (acétone / toluène / acide formique (6/8/1), a permis de purifier le composé majoritaire

#### **3.4.6 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des tiges LFt3**

L'extrait LFt2 (9g) a été fractionné par CO, en utilisant un système de solvant a été choisi par CCM, il s'agit du système (acétone / toluène / acide formique (6/8/1), Après analyse par CCM, 12 fractions ont été obtenues (LFF3-1 à LFF3-12).

#### **3.4.7 Etude phytochimique de l'extrait par l'éther d'éthyle des rameau LFr1**

L'extrait éthyle (5,8 g) a été séparée sur gel de silice par chromatographie sur colonne ouverte en utilisant un système de solvant , (acétone / toluène / acide formique (6/8/1), Après analyse par CCM, cinq fractions ont été obtenues (LFR1-1 à LFR1-5).

#### **3.4.8 Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des rameau LFr2**

L'extrait LFr2 (9 g) a été fractionné par LC-UV . Le système de solvant a été choisi par CCM, il s'agit du système (EtOAc/ MeOH/eau 10/1.5/1). Après analyse par CCM, six fractions ont été obtenues.

#### **3.4.9 Etude phytochimique de l'extrait par le butanol des rameau LFr3**

Une séparation sur colonne chromatographie a été réalisée sur 5 g de l'extrait butanolique LFr3 en utilisant un système de solvant , (acétone / toluène / acide formique (6/8/1), en vue d'obtenir 9 fraction .

### 3.5. Caractérisation des produits obtenus

L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que la spectroscopie d'absorbance ultraviolette, infrarouge et la résonance magnétique nucléaire et par comparaison avec les données de la littérature.

#### 3.5.1 Spectrophotométrie ultraviolet (UV)

Les spectres UV des composés sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UNICAM UV300 (thermospectronic 32).

#### 3.5.2 Spectroscopie infrarouge (IR)

Les analyses IR, ont été effectués sur un spectrophotomètre FTIR Avatar 320, en pastille KBr, les bandes d'absorption sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.5.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN monodimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) sont réalisés sur spectrophotomètre Bruker GP\*250 ( $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz) et sont traités par le logiciel MestReNova (version 6.0.2-5475). Les déplacements chimiques en ppm des solvants deutériés utilisés pour les analyses sont exprimés par rapport au TMS.

### 3.6. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant

Dans le test du DPPH, les antioxydants réduisent le radical DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) ayant une couleur violette en un composé jaune (diphénylpicryl-hydrazine) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (CHEN C.N et al, 2004). Pratiquement, une solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 25  $\mu\text{L}$  des solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique sont ajoutés à 975  $\mu\text{L}$  de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc de méthanol. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de méthanol (LEITÃO G.G et al, 2002).

L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

- Ac : Absorbance à 517 nm du contrôle.
- At : Absorbance à 562 nm de l'extrait testé.

Deux autres paramètres sont introduits pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire; la concentration effective à 50% (EC50) et le pouvoir anti-radicalaire (APR = 1/EC50). IC50 (aussi appelée EC 50 pour Efficient concentration 50), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la progression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées (SCHERER et GODOY, 2009)

### 3.7. Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire

#### 3.7.1 Matériel Animal

En recherche biomédical, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de la biologie ou des comportements normatifs, ou d'un processus pathologique spontané ou induit ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain. Dans cette étude, on a induit l'inflammation chez la souris, variété Swiss albinos. Les souris mâles et femelles, sont âgés de 2 mois avec un poids qui varie entre 25 et 35 g. Ces animaux ont été procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été placés dans des cages en polypropylène où ils ont accès libre à l'eau et à l'alimentation. Les souris sont maintenues à une température ambiante 25°C. Les animaux ont bénéficiés d'une période d'adaptation de 30 jours avant leur utilisation. L'aliment a été acheté auprès de GAO ORAVIO SPA aliments pour le bétail Béchar.

Les conseils généraux pour l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis (COUNCIL OF EUROPEAN COMMUNITIES, 1989).

#### 3.7.2 Appareils

Le pléthysmomètre LE 7500 (Annexe 7) c'est un appareil de mesure du volume de la patte de la souris soit en valeur absolue, soit en valeur relative par comparaison avec la patte non traitée. Il est composé d'une cellule de mesure contenant une solution saline (0,5

g/litre d'eau distillée plus 3 ml d'une solution imbibante) dans laquelle plonge la patte de la souris (Principe d'Archimède) et la petite différence du niveau de l'eau après immersion de la patte est mesurée par un transducteur de conception et est affichée sur un appareil numérique.

### 3.7.3 Etude de la toxicité aiguë des extraites

Trois lots de 3 souris préalablement mis à jeun pendant 17 h sont constitués de la façon la plus homogène possible et reçoivent en intra-péritonéale respectivement des doses de 50 ; 100 ; 150 mg/kg de solution des extraites étudiées et/ou produit isolé. Des observations sont faites au bout de 2 heures, 24 heures comparativement à un lot témoin qui ne reçoit que de l'eau distillée. La période d'observation a duré 30 min après l'administration de l'extrait, un examen de tous les animaux avait lieu, afin d'y déceler des symptômes de morbidité et de mortalité. Les symptômes relevés incluaient, de façon non limitative, les changements affectant le battement du cœur la respiration, la démarche, de stéréotypes (par exemple, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, marche à reculons). Les souris mortes sont dénombrées et les valeurs enregistrées pour en déterminer les doses toxiques.

### 3.7.4 Test anti-inflammatoire

La recherche de propriétés anti-inflammatoires a été réalisée sur le modèle de l'œdème plantaire induit chez la souris (mal et femelles) par l'injection d'une solution à 1% (0.1ml) de formol dans la patte droite ; technique inspirée de celle décrites par Winter et al. (WINTER *et al.*, 1962, ABENA *et al.*, 1997)

Les produits testés ont été administrés par injection intra-péritonéale 30 min avant l'injection de formol. Les souris ont été mis à jeun 17 heures avant le traitement et divisés en cinq groupes de trois souris chacun. Le groupe A témoin reçu du NaCl 0.9% (10ml/Kg PC) seulement ; les groupes B ont été traités avec 25 mg /Kg PC d'extrait aqueux de *L.feei* . Les souris du groupe C

traités avec l'extrait acétonique (50 mg /Kg PC) et le groupe D : traité avec l'extrait d'acétate d'éthyle LFf2 (50 mg /Kg PC), le groupe E : traité avec l'extrait butanolique LFf3 (100 mg /Kg PC); et les souris du groupe F ont été traités avec le diclofénac (25 mg /Kg PC) , anti-inflammatoire non stéroïdien de référence, à la dose de 25mg/Kg PC . L'évaluation de l'œdème a été suivie par l'enregistrement du volume de la patte inflammée 0, 30, 60, 120, 180

min après l'injection de l'agent phlogogène . Pour chaque groupe traité, les volumes moyens obtenus à ces différents relevés (vt) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (Vo), L'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évolution ont été estimés par la détermination des pourcentages d'inhibition de l'œdème, calculé à partir de la formule :  $[(Vt - Vo)_{\text{témoin}} - (Vt - Vo)_{\text{traité}}] / (Vt - Vo)_{\text{témoin}} \times 100$  (AMEZOUAR *et al.*, 2013)

### 3.7. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard (Moyenne  $\pm$  SD). Les résultats des différents tests sont analysés par le test-t de Student est utilisé pour évaluer la signification des effets des différentes substances testées in vitro et in vivo. Les différences ont été considérées significatives au seuil de probabilité de 5 % ( $p < 0,05$ ). La corrélation fait par la régression linéaire est exprimée par le coefficient de corrélation ( $R^2$ ).

### 3.8 Conclusion

Cette troisième partie a eu pour but la présentation du cheminement et la description des méthodes que nous avons suivi pour l'identification et l'isolement des composés actifs existants dans une source d'origine végétale. Nous avons vu la description du matériel végétal choisi *Limoniastrum feei*.

Dans cette étude nous avons présenté le principe :

- Des techniques d'extraction solide-liquide (macération, extraction, par différents solvants).
- Des méthodes de caractérisation des extraits (CCM, CCO).
- Des méthodes utilisées pour le fractionnement et la purification des extraits

Des tests appliqués afin de déterminer l'activité antioxydante des extraits (test DPPH) ainsi que l'activité anti-inflammatoire.

Le fait d'avoir caractérisé le matériel végétal et d'avoir présenté les étapes nécessaires pour l'extraction et l'analyse des principes actifs extraits nous a permis de mieux choisir les conditions de déroulement de nos travaux de recherche dont les résultats sont discutés dans la partie résultats et discussion de ce manuscrit.



# *Chapitre 4*

## *Résultats et Discussion*



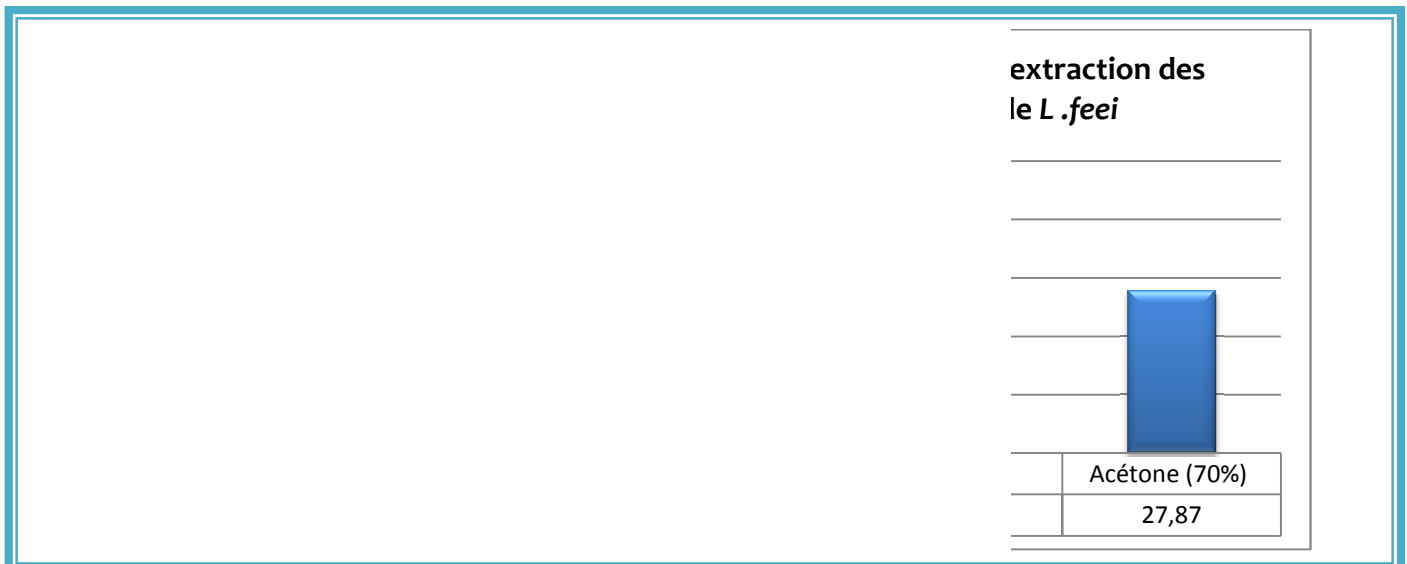
## CHAPITRE 4

### Resultat et discussion

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (**HOSTETTMANN et WOLFENDER, 2004**).

#### 4.1 Rendements en extraits bruts

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétale et présentés dans la **Figure 4.1**



**Figure 4.1** Rendement d'extraction (%) obtenu par ESL

Les résultats obtenus, montrent que la plante *Limoniastrum feei* présente des rendements plus ou moins élevés avec une prédominance des rendements obtenus dans l'extraction des feuilles.

Les rendements d'extraction observés dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant d'extraction. On constate que quelque soit l'organe utilisé, le rendement d'extraction obtenu avec la décoction est toujours plus élevé sauf pour les tiges où les valeurs se rapprochent. Par ailleurs, la quantité des molécules extraites est supérieure dans les feuilles (27.87%) par rapport aux autres organes.



A partir de résultats (tableau 4.1) en remarque la rentabilité en poids, suivi par le solvant plus polaire c'est le butanol qui donne la proportion plus élevés (1.51%) de la partie tige. L'acétate d'éthyle est le solvant plus polaire qui donne un taux de (0.62%) de la partie feuille, par contre le diéthyl éther est le solvant moins polaire que acetate et butanol, qui possède le rendement le plus faible à (0.37%).

Les résultats obtenus pour les rendements d'extraction des différents solvants organiques de la partie feuille de *L. feei* sont en accord avec ceux rapportés par EL-HACI Imad (2014), qui ont rapportés un rendement de l'ordre de 18.51 % pour l'extrait acétonique et 0.48 % pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Une autre étude faite par Boulenouar et al. (2012), révèle un rendement d'extraction par l'acétate d'éthyle de l'ordre de 1.30 %, ces valeurs est très proche à celle que nous avons trouvée dans notre étude.

#### 4.1.2 Purification des composés

Les différents extraits obtenus ont été analysés par CCM et par CL-UV analytique. Un préfractionnement a ensuite été réalisé, par séparation sur colonne ouvert, en fonction des profils obtenus, de la polarité, de la masse de l'extrait. Pour certains extraits, une partition liquide/liquide a été réalisée au préalable. Les conditions pour réaliser ces préfractionnements ont été optimisées en choisissant comme éléments importants la présence de flavonoïdes (utilisation spectres UV), les polarités et les masses suffisantes des extraits bruts.

Pour la purification des sous-fractions obtenues, plusieurs étapes de séparation ont en général été nécessaires, en utilisant différentes techniques chromatographiques (colonnes ouvertes sur gel de silice, CCM).

A la fin de chaque étape de séparation, les fractions obtenues sont analysées par CCM, UV et, éventuellement par RMN <sup>1</sup>H, pour permettre de réunir les fractions qui présentent le même profil et déterminer un nouveau support chromatographique ainsi qu'un nouveau système de solvant susceptible de mieux séparer les composés.

#### 4.1.3 Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait acétone /eau

Par le biais de système E1: acétone / toluène / acide formique (6/8/1), nous avons pu mettre en évidence chez *Limoniastrum feei* dans la phase d'éthyle d'éther de la partie

feuille, quatre (4) composés seulement et la présence de trois (3) composés dans les deux parties rameau et tige (Tableau 4 .1). Dans la phase acétate d'éthyle de la partie feuille, cinq (5) composés et trois (3) composés pour la partie rameau et quatre (4) de la partie tige.

**Tableau 4 .1 :** Résultats de la chromatographie sur couche mince sur gel de silice de l'extrait acétone /eau, Système 1 (E1) acétone / toluène / acide formique (6/8/1), système 2 (E2) acétate d'éthyle /Méthanol /eau (10/1,5/1).

Feuille						
fraction	Rendement	Couleur de fraction	Rf (E1)	Rf (E2)	Couleur de fluorescence	λ (nm) UV
Ether d'éthylique	0.30	jaune	0.30	0.70	mauve	254
			0.49	0.80		
			0.57	0.90		
			0.69	0.36		
				0.54		
			0.63			
			0.67			
Acétate d'éthyle	0.62	Jaune pâle	0.06	0.55	mauve	254
			0.13	0.60		
			0.20	0.80		
			0.27			
			0.46			
Butanol	0.81	Rouge brique	-	0.85	mauve	254
				0.36		
				0.54		
				0.63		
Rameau						
Ether d'éthylique	0.15	Jaune pâle	0.53	-	violet	365
			0.66			
			0.77			
Acétate d'éthyle	0.46	Jaune	0.53	-	violet	365
			0.66			
			0.77			
Butanol	1.51	Jaune citron	0.57	-	violet	365
Tige						
Ether d'éthylique	0.37	Jaune pâle	0.30	-	violet	365
			0.50			
			0.60			
			0.66			
Acétate d'éthyle	0.48	Jaune	0.36	-	mauve	254
			0.50			365
			0.60			
			0.66			
Butanol	0.34	Marron	0.30	-	mauve	365
			0.50			

En ce qui concerne la phase n-butanol, nous avons révélé la présence d'un seul composé pour la partie rameau et deux (2) composés de la partie tige, alors que la partie feuille n'a révélé aucun composé (Tableau 4.1). On a arrivé a séparé un composé dans l'extrait butanol a un  $R_f=0.57$ .

Dans le système (E2) : acétate d'éthyle /Méthanol /eau (10/1,5/1) nous a révélé le plus de taches dans les fractions d'éther et d'acétate d'éthyle de feuilles, ainsi, nous avons révélé à 254 nm la présence de quatre tache dans la fraction butanolique à  $R_f=0.85, 0.36, 0.54, 0.63$  de couleur mauve .

Les résultats d'analyse indiquent la présence au totale de cinq (5) composés, dont le composé à  $R_f=0.50$  (Tableau 4.1) apparait dans les trois fractions de l'extrait de tige .Nous signalons que les deux fractions d'éther et d'acétate d'éthyle, contiennent presque les mêmes constituants comparés par rapport à l'extrait des rameaux, nous avons révélé la présence du composé à  $R_f=0.66$  dans les deux fractions d'éther et acétate d'éthyle.

## 4.2 Analyse structurale des composés

Les composés isolés sont identifiés par un code du type LFX (pour *Limoniastrum feei* ) où X ne correspond pas à l'ordre de purification, mais à l'ordre d'apparition du composé dans la partie analyse structurale des composés.

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyses spectroscopiques particulièrement, la RMN  $^1D$  de  $^1H$  et de  $^{13}C$ , IR, UV et par comparaison avec les données de la littérature.

Il apparait, après analyse structurale que les composés isolés appartiennent pour la majorité à deux classes de molécules : les flavones et isoflavone , la plupart des composés sont Substitué , avec essentiellement des groupes hydroxyl et/ou groupement méthoxy . De plus, un composés est prénylé, avec essentiellement des prénylations linéaires de type 3,3-diméthylallyl (3,3-DMA) .

### 4.2.1 Elucidation structurale du composé LF1

Le composé LF1 a été isolé à partir de l'extrait éthylique des tiges (LFt1) ,sous forme d'une poudre de couleur jaune. Son spectre UV présente des maxima à 265 ; 275 nm, caractéristiques d'une isoflavone.

Au spectre IR (Annexe 1) nous avons constaté la présence de deux bandes à  $3404\text{ cm}^{-1}$ ,  $3235\text{ cm}^{-1}$  élargis typiques pour les vibrations d'élongation de la liaison OH.

Les deux bandes apparaissent dans la région  $2918\text{ cm}^{-1}$  et  $2841\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques aux protons méthyliques et le groupe vinylique  $-\text{CH}=\text{CH}$  et une bande d'absorption intense à  $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1756\text{ cm}^{-1}$   $1629\text{ cm}^{-1}$  caractéristique d'une fonction  $\text{C}=\text{O}$  carbonyle et  $\nu(\text{C}=\text{C}) = 1629\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu(\text{C}=\text{C}) = 1514\text{ cm}^{-1}$  caractéristique d'une fonction  $\text{C}=\text{C}$  aromatique, Les bandes à  $\nu = 1377\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1115\text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ;  $\nu = 1039\text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C-O de la fonction OH.

L'analyse du spectre RMN<sup>1</sup>H, réalisé dans  $\text{CDCl}_3$  (Figure 4.2) montre que ce composé fait également partie de la classe des isoflavones, notamment en raison de la présence d'une signale à base champ, d'intégration 1H, correspondant au proton de la position 2, repéré à ( $\delta_{\text{H}}$  8.04 ppm). En outre, l'observation deux signaux sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  7.16 ppm (1H,d, J = 1.5 Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  7.09 ppm (1H,d, J = 8.4 Hz) attribuables aux protons H-2' et H-5' respectivement, ainsi que d'un signal sous forme d'un doublet de doublet  $\delta_{\text{H}}$  7.40 (J= 1.51 et J = 8.4 Hz); attribuable à H-6' atteste de l'appartenance de ce composé à la famille des isoflavone.

Deux signaux sous forme des singulet à  $\delta_{\text{H}}$  3.81 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  3.78 ppm attribuables aux groupements méthoxyle (4'-OMe et 3'-OMe) respectivement.

Les données obtenues par l'analyse du spectre RMN<sup>13</sup>C confirment bien notre hypothèses en ce qui concerne isoflavone avec la localisation :

D'un carbone oxyméthine (CH-O) à  $\delta_{\text{C}}$  154.55 attribuable au carbone C-2. Un carbone à 132 ppm attribuable au carbone C-3. La valeur du déplacement chimique de ce dernier indique qu'il est le point de branchement de cycle C avec le cycle B. Des carbones à  $\delta_{\text{C}}$  193.15(C-4),  $\delta_{\text{C}}$  167.21(C-5),  $\delta_{\text{C}}$  103.54(C-6),  $\delta_{\text{C}}$  161.44 (C-7), 99.98 (C-8), 155.23(C-9), 109.05(C-10), 120.91(C-1'), 112.49(C-2'), 148.81(C-3'), 145.05 (C-4'). De même que pour les groupements méthoxy, le spectre RMN <sup>13</sup>C montre la présence : Des signaux à 60.65 (6-OMe), 61.91 (7-OMe), 61.51 (8-OMe), 55.89 (4'-OMe), 55.32 (3'-OMe).

L'ensemble de données obtenues et la comparaison avec les données de la littérature (MARKHAM, 1975; SCHMIDT *et al*, 2013), nous a permis, d'attribuer la structure au produit LF1, à un flavonoïdes qui porte un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone C5, qui est la 6, 7, 8, 3', 4'-Pentaméthoxy 5-hydroxy isoflavone.

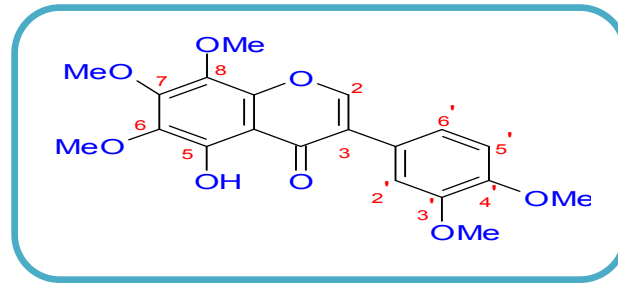


Figure 4.2 Structures proposées du composé LF1, la 6,7,8,3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone

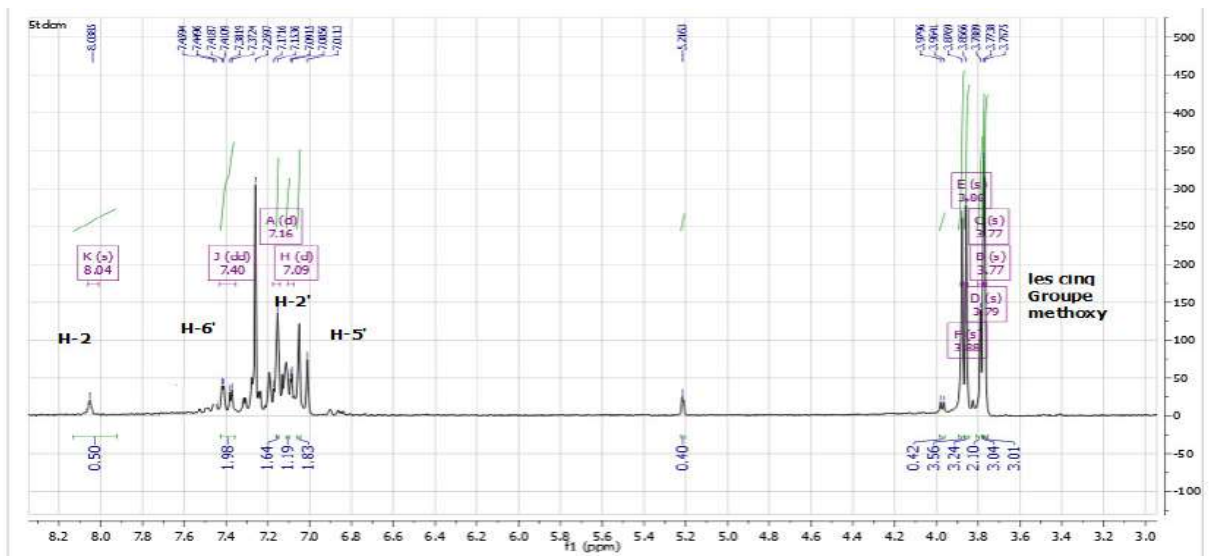


Figure 4.3 Spectre RMN <sup>1</sup>H de LF1 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

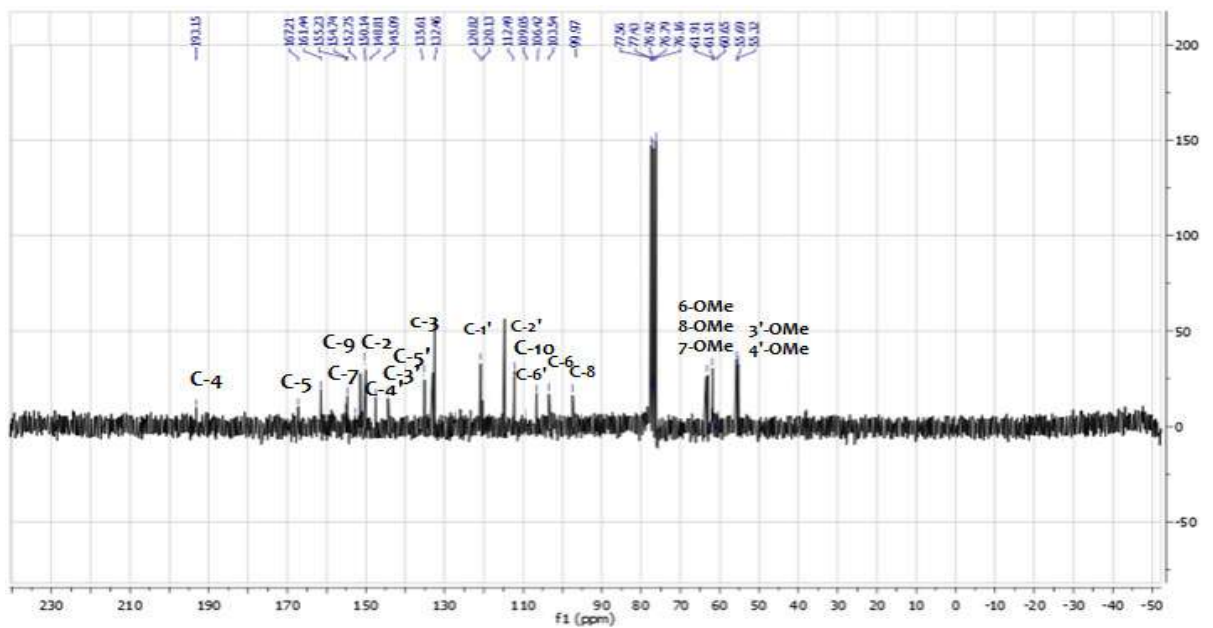


Figure 4.4 Spectre RMN <sup>13</sup>C de LF1 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Tableau 4.2 :** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de LF1 dans CDCl<sub>3</sub>.

RMN <sup>1</sup> H				RMN <sup>13</sup> C	
Position	δ <sup>1</sup> H (ppm)	m	J (Hz)	position	δ <sup>13</sup> C (ppm)
H-2	8.04	s	–	C-2	154.55
H-2'	7.09	d	1.51	C-3	132.00
H-5'	7.16	d	8.40	C-4	193.15
H-6'	7.40	d	1.51-8.40	C-5	167.21
4'-OMe	3.81	–	–	C-6	103.54
3'-OMe <sub>3</sub>	3.78	–	–	C-7	161.44
6-OMe	3.97	–	–	C-8	99.98
7-OMe	3.92	–	–	C9	155.23
8-OMe	3.86	–	–	C-10	109.05
				C-1'	120.91
				C2'	112.49
				C-3'	148.81
				C4'	145.05
				C5'	135.61
				C-6'	106.42
				3'-OMe	55.32
				4'-OMe	55.89
				7-OMe	61.91
				6-OMe	60.65
				8-OMe	61.51

#### 4.2.2 Elucidation structurale du composé LF2

Le composé **LF2** a été isolé sous forme d'une poudre de couleur jaune-orangée à partir de l'extrait par l'acétate d'éthyle des rameau (LFr2). Son spectre UV présente un maximum à 372nm, 286nm 272 nm.

Le spectre Infrarouge du produit isolé **LF2** (Annexe 2) nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorptions observées permettent de déduire la présence des carbonés comportant des groupes CH<sub>3</sub>, ainsi que la présence d'un groupement hydroxyle –OH d'une fonction alcool et une double liaison C=C. Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

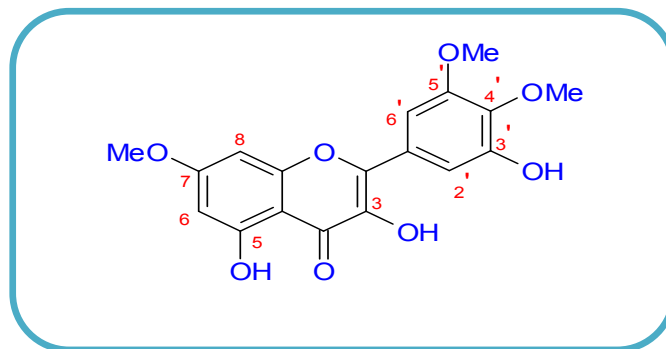
- $\nu = 3410 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison O-H ;  $\nu = 2847 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation des liaisons C-H ;  
 $\nu = 1689 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C=O
- $\nu = 1558 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C=C ;  $\nu = 1430 \text{ cm}^{-1}$  Déformation des liaisons O-H
- $\nu = 1377 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1115 \text{ cm}^{-1}$ , et  $\delta = 771 \text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ;  $\nu = 1033 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C-O de la fonction alcool.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **LF2** enregistré dans  $\text{CDCl}_3$ , permet d'observer (Tableau 4.4). Des signaux sous forme de singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6.92 ppm, 7.40 attribuable aux protons H-6, H-8 respectivement. Deux signaux sous forme de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  7.37 ppm, 7.48 ppm attribuable aux protons H-6' (d,J=1,4Hz), H-2' (d,J=1,4Hz) et respectivement. Par ailleurs on observe trois signaux singulet résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  3.12 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3.06 ppm et 3.68 ppm s'intégrant pour trois proton et attribué au proton méthoxyle ( $\text{OCH}_3$ ).

L'analyse de spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (75MHz dans le  $\text{CDCl}_3$ ) dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.4 révèle la présence de dix-huit atomes de carbone dans le composé **LF2**, avec en particulier les signaux suivants :

Un signal à  $\delta=174.66$  ppm est attribuable au carbonyle de cycle. On y observe également trois signaux à  $\delta=56.49$  ppm (7-OMe),  $\delta=55.77$  (3'-OMe) ppm et à  $\delta=56.00$  (4'-OMe) ppm relatif aux groupements méthoxyle. Par ailleurs, les signaux à  $\delta$  C 164.04 (C-2) et à  $\delta$  C 130.29 (C-3) et 152.32 (C-5),  $\delta$  C 130.29 (C-6). 140.49 (C-7), 96.71 (C-8), 155.90 (C-9), 103.44 (C-10), 121.81 (C-1'), 110.25 (C-2'), 140.49 (C-3'), 146.05 (C-4'), 137.01 (C-5'), 110.25 (C-6') attribuables aux proton des cycles A,B,C.

De ce qui précède, le composé **LF2**, il s'agit d'un 5,3'-dihydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol connu sous le nom 5',4',7-Trimethylmyricetin. Ce composé est identifiés dans les feuilles *Solanum habrochaites* (LI et al, 2012 ; SCHMIDT et al, 2013).



**Figure 4.5** Structures proposées du composé **LF2**, la 3',5 hydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol

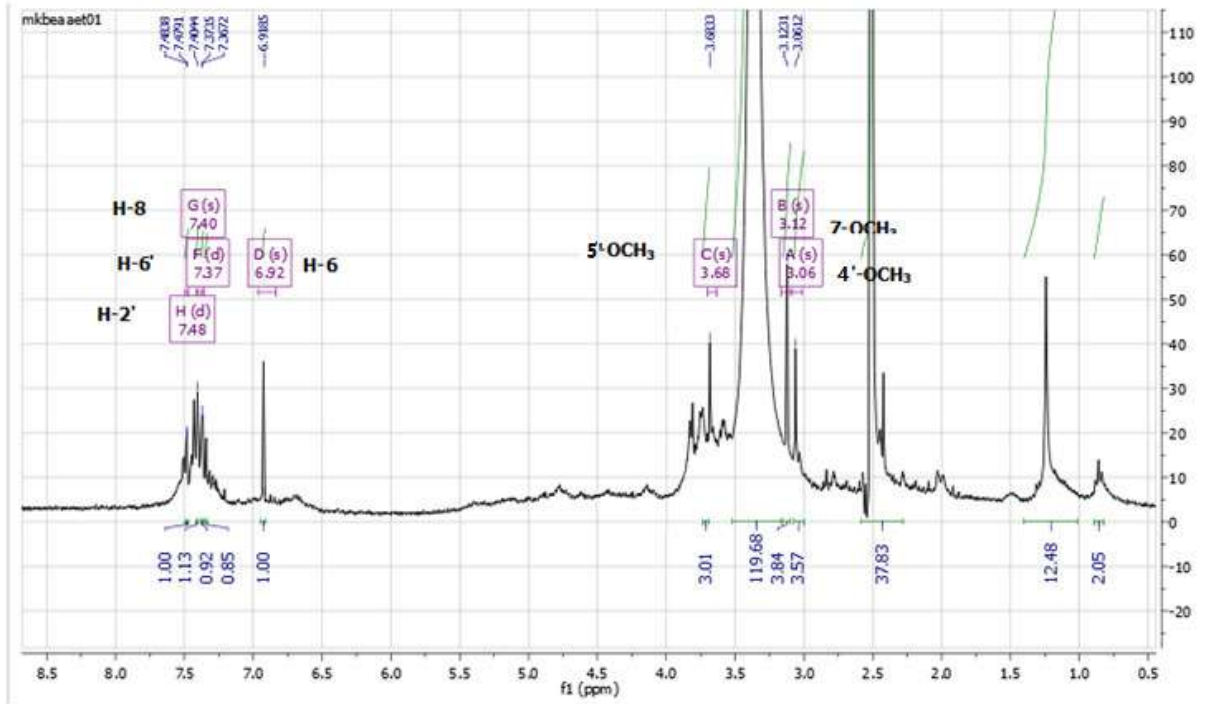


Figure 4.6 Spectre RMN  $^1\text{H}$  de LF2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

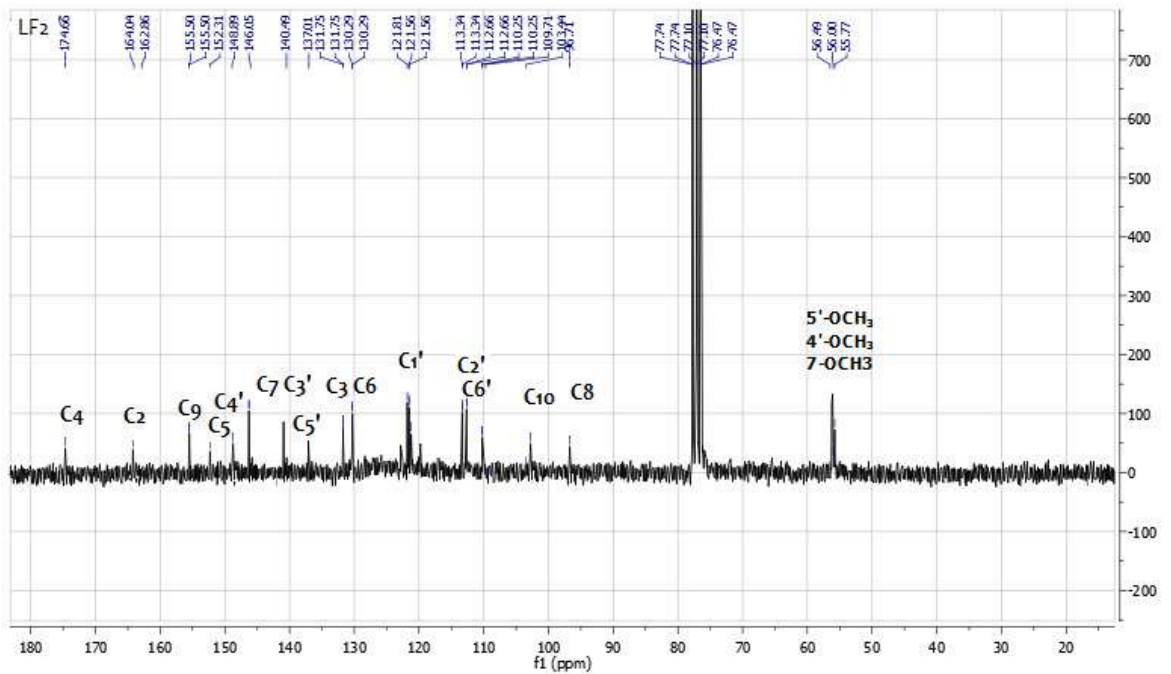


Figure 4.7 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de LF2 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Tableau 4.3 :** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de **LF2** dans  $\text{CDCl}_3$ .

RMN $^1\text{H}$				RMN $^{13}\text{C}$	
Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	m	J(Hz)	position	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
H-6	6.92	s	–	C-2	164.04
H-8	7.40	s	–	C-3	130.29
H-2'	7.48	d	1,4	C-4	174.66
H-6'	7.37	d	1,4	C-5	152.32
7-OMe	3.12	s	–	C-6	130.29
3'-OMe	3.06	s	–	C-7	140.49
4'-OMe	3.23	s	–	C-8	96.71
				C9	155.90
				C-10	103.44
				C-1'	121.81
				C2'	110.25
				C-3'	137.10
				C4'	146.05
				C5'	137.01
				C-6'	110.25
				3'-OMe	55.77
				4'-OMe	56.00
				7-OMe	56.16

### 4.2.3 Elucidation structurale du composé LF3

Le composé LF3 se présente sous forme d'une poudre jaune clair. Il a été isolé de l'extrait ethylique des rameau (LFr1). Son spectre UV est caractéristique de celui d'un flavone avec deux maxima (288nm, 329nm).

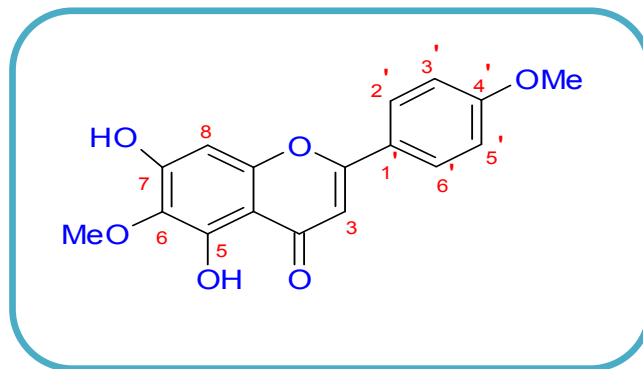
La spectroscopie d'absorption infrarouge (Annexe 3) montre la présence de la fonction OH par l'existence de bandes caractéristiques à  $3404.55\text{ cm}^{-1}$ . La vibration d'élongations à  $2847.34\text{ cm}^{-1}$  confirment la présence d'un groupement méthyle. Une bande à  $\nu = 1716.75\text{ cm}^{-1}$ , caractérisant la fonction carbonyle. Deux bandes attribuable à la fonction C=C aromatique et aliphatique à  $\nu = 1612\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 151\text{ cm}^{-1}$  respectivement. Une bande à  $\nu = 1459\text{ cm}^{-1}$ : déformation de la liaison OH. Les bandes à  $\nu = 1383.31\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1219\text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques;  $\nu = 1091\text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C-O de la fonction OH. Les bandes à  $\delta = 985\text{ cm}^{-1}$ ,  $694\text{ cm}^{-1}$  et  $\delta = 745\text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C=C-H.

Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) présente le signal caractéristique du proton en position 3 de flavone à  $\delta_{\text{H}} 7,00\text{ ppm}$ . Un doublet à  $\delta_{\text{H}} 7,49\text{ ppm}$  (2H,  $J=7,9$ ) correspondent à deux protons H2' et H6' et un doublet à  $\delta_{\text{H}} 7,19\text{ ppm}$  (1H,  $J=7,9\text{ Hz}$ ) correspondent à

deux protons aromatiques situés sur le cycle B. Deux singulet à  $\delta_H$  3,81 ppm et  $\delta_H$  3,88 ppm intégrant pour 3H correspond à deux groupement méthoxyle positionné sur le cycle B et cycle A.

Le spectre RMN  $^{13}C$  enregistré dans le  $CDCl_3$  (tableau 4.5) révèle la présence de 17 atomes de carbones, parmi ces atomes de carbone on en dénombre un signale à  $\delta=180.60$  ppm est attribuable au carbonyle de cycle C. On y observe également deux signaux à  $\delta=56.24$  ppm et à  $\delta=56.84$  ppm relatif aux groupements méthoxyle. nous observons un signale situés à 103.80 ppm correspondent au carbone de la position 3. Un signale à  $\delta=96.71$  ppm est attribuable au CH du cycle A, les autres signaux sont attribués d'une part aux groupements CH du cycle B [113.73ppm, 110,00ppm ,119.77ppm]

Ces données, qui correspondent à celles de la littérature, permettent d'identifier le composé LF3 comme la 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone ou pectolinarigenine (IMRE *et al.*, 1977) déjà isolée de propolis des abeilles (SEGUENI *et al.*, 2013).



**Figure 4.8** Structures proposées du composé LF3, 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone

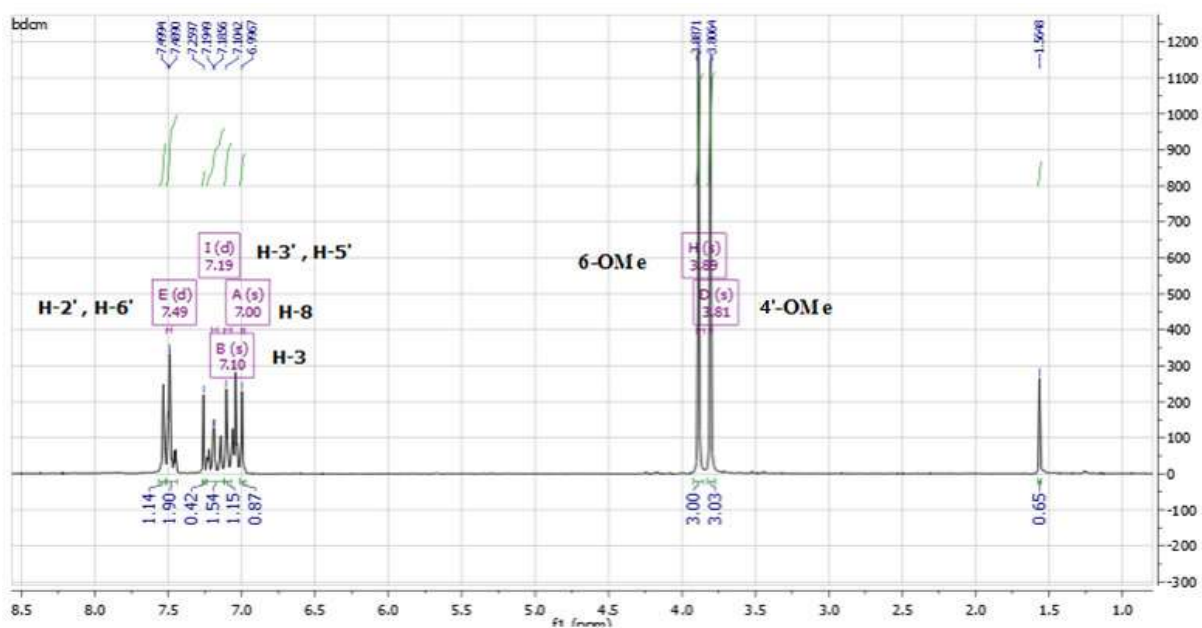


Figure 4.9 Spectre RMN  $^1\text{H}$  de LF<sub>3</sub> (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

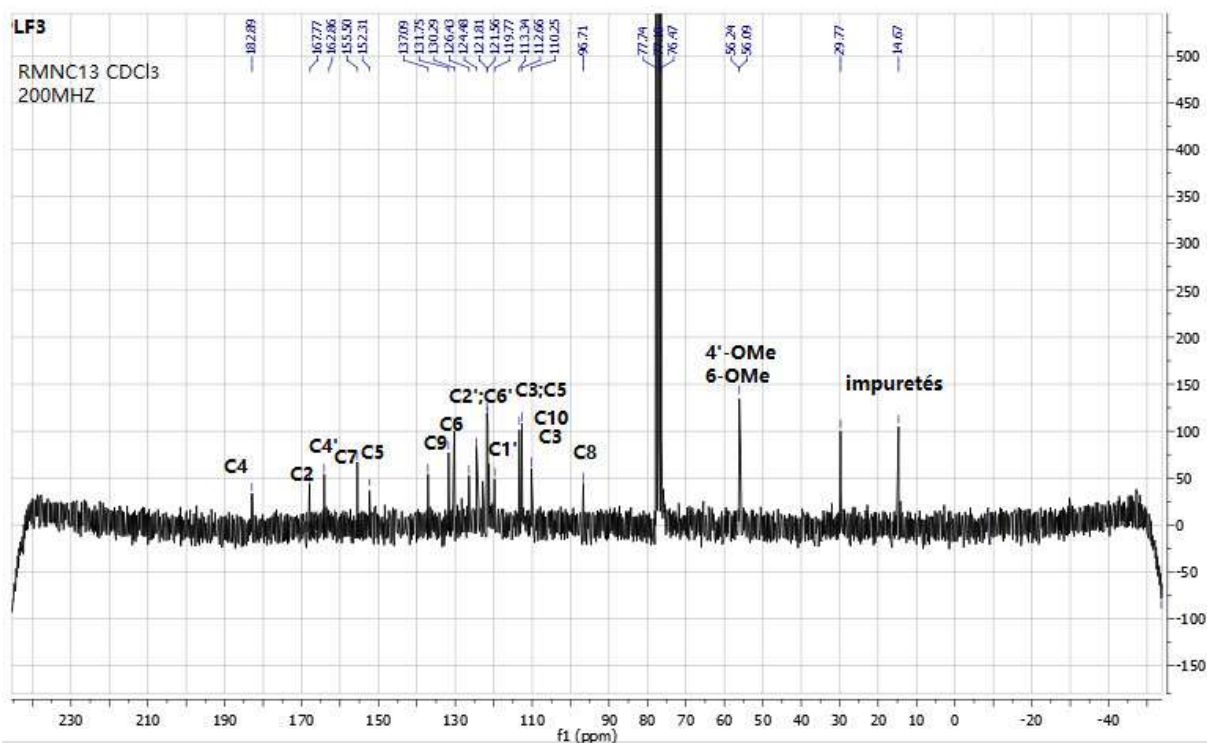


Figure 4.10 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de LF<sub>3</sub> (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Tableau 4.4** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de LF3 dans CDCl<sub>3</sub>.

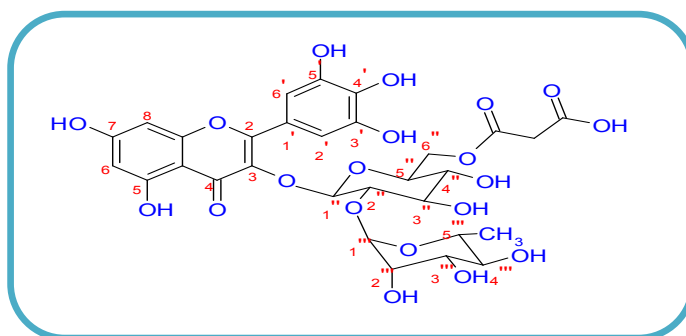
RMN <sup>1</sup> H				RMN <sup>13</sup> C	
Position	δ <sup>1</sup> H (ppm)	m	J(Hz)	position	δ <sup>13</sup> C (ppm)
H-8	7,00	s	–	C-2	163.04
H-3	7,10	s	–	C-3	103.9
H-3'	7.19	d	7,9	C-4	182.60
H-5'	7,19	d	7,9	C-5	152.15
H-2'	7,49	d	7,9	C-6	131.29
H-6'	7,49	d	7,9	C-7	155.23
4'-OMe	3.81	s	–	C-8	94.25
6-OMe	3.88	s	–	C9	151.90
				C-10	104.10
				C-1'	123.70
				C2'	126.75
				C-3'	113.48
				C4'	160.93
				C5'	113.48
				C-6'	126.75
				4'-OMe	56.09
				7-OMe	56.84

#### 4.2.4 Elucidation structurale du composé LF4

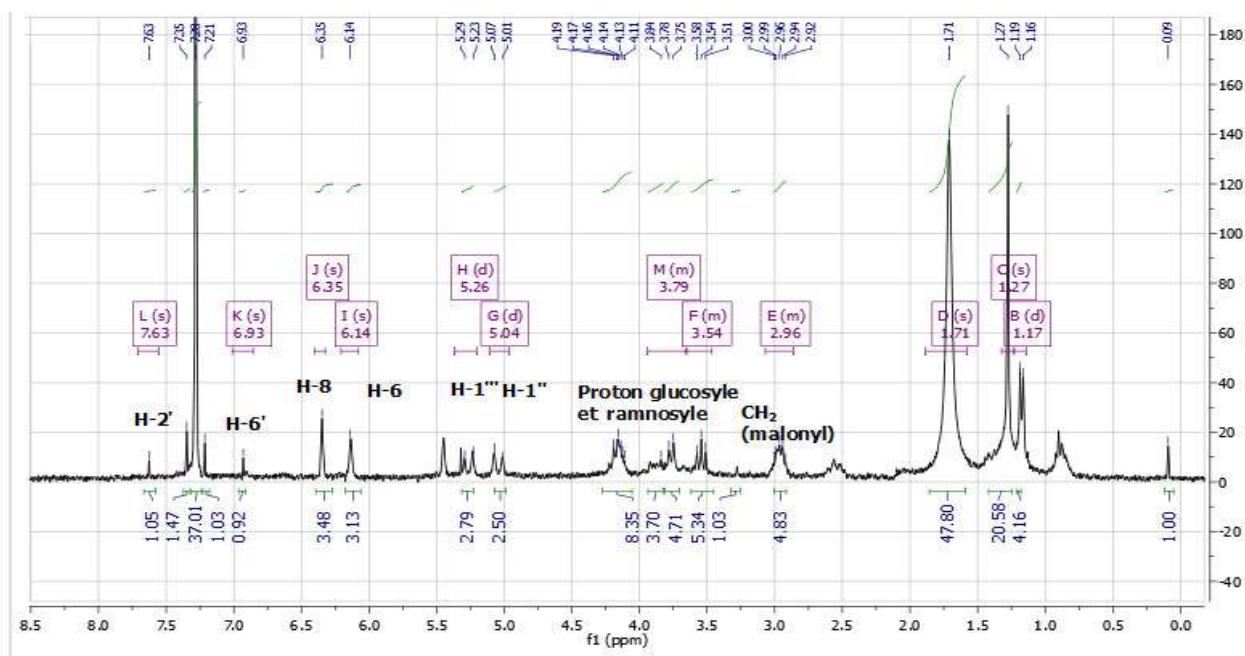
Le composé LF4 a été isolé de l'extrait butanolique des feuilles (LFf3) sous forme d'une poudre jaune. Son spectre UV présente plusieurs maxima à 281nm, 296nm, 334nm. La spectroscopie d'absorption infrarouge (Annexe 4) montre la présence de la fonction OH. Par l'existence de bandes caractéristiques à 3393. Les bandes à 2951, 2923, 2862 confirment la présence d'un groupement méthyle et méthylène (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>). Une bande à  $\nu = 1711 \text{ cm}^{-1}$ , caractérisant la fonction carbonyle de groupement (CH<sub>3</sub>COO). Tandis que dans la fréquence  $\nu = 1640 \text{ cm}^{-1}$ , caractérisant la fonction carbonyle de cycle C (C4). Deux bandes attribuables à la fonction C=C aliphatique et aromatique à  $\nu = 1601 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1514 \text{ cm}^{-1}$  respectivement. Une bande à  $\nu = 1121 \text{ cm}^{-1}$  et  $\nu = 1028 \text{ cm}^{-1}$ : Elongation de la liaison C-O.

L'analyse par RMN <sup>1</sup>H, réalisée dans CDCl<sub>3</sub>, permet de mettre en évidence la présence des signaux sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6.14 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  6.35 ppm  $\delta_{\text{H}}$  6.93 ppm  $\delta_{\text{H}}$  7.63 ppm attribuable aux protons H-6 et H-8, H-6', H-2' respectivement. Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  1.03 ppm correspondant au proton méthyle du rhamnose. On remarque également la présence de deux signaux à  $\delta_{\text{H}}$  5.05 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  5.21 ppm attribuable à H-1'' et H-1''' respectivement ces signaux sont compatibles avec les signaux des protons glucosidiques. On

observe aussi des signaux résonants entre 3.51- 3.84 ppm qui sont relatifs aux autres protons glucoside. Par ailleurs on observe des signaux résonnant dans la région  $\delta_H$  4.11 –4.19 ppm et attribuable aux protons rhamnose. Dans la région des protons résonants à 2.92, 3.00 attribué aux protons de malonyl . Un doublet large à  $\delta =1.17$  ppm (d,J=9Hz) d'intégration 3H correspondant au protons méthyle du rhamnose . Enfin, par comparaison avec les données de la littérature **LF3** est identifié comme étant la 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5, 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol. (MARKHAM, 1993 ; HARBORNE , 1993 ; GUAN *et al.* 2008 ;TING *et al.*, 2009 ; YOUNG HAE *al.*,2009 ).



**Figure 4.11** Structures proposées du composé **LF4**, la 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5, 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol.



**Figure 4.12** Spectre RMN  $^1H$  de **LF4** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

**Tableau 4.5 :** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  de LF4 dans  $\text{CDCl}_3$ .

RMN $^1\text{H}$			
Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	m	J (Hz)
H-6	6,14	s	–
H-8	6,35	s	–
H-6'	6,93	s	–
H-2'	7,63	s	–
1''	5.04	d	7,4
2'',3'',4'',5'',6''	3.51-3.84	m	–
1'''	5.26	d	9.8
2''',3''',4''',5'''	4.11–4.19	m	–
Malonyl	2.92, 3.00	m	–
$\text{CH}_3$ du rhamnose	1.17	d	9.00

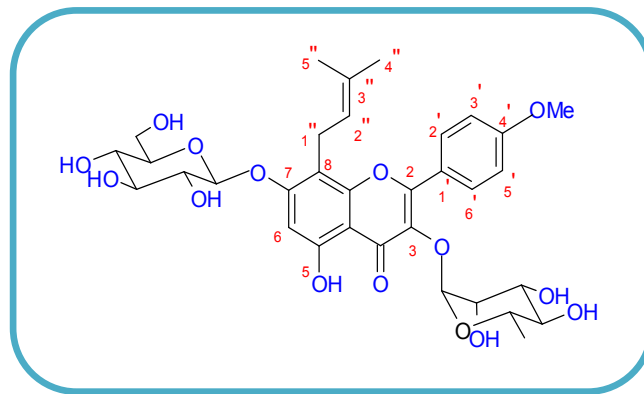
#### 4.2.5 Elucidation structurale du composé LF5

Le composé LF5 a été isolé de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles (LFf2) sous forme d'une poudre jaune . Son spectre UV présente plusieurs maxima à 220, 298 et 352 nm.

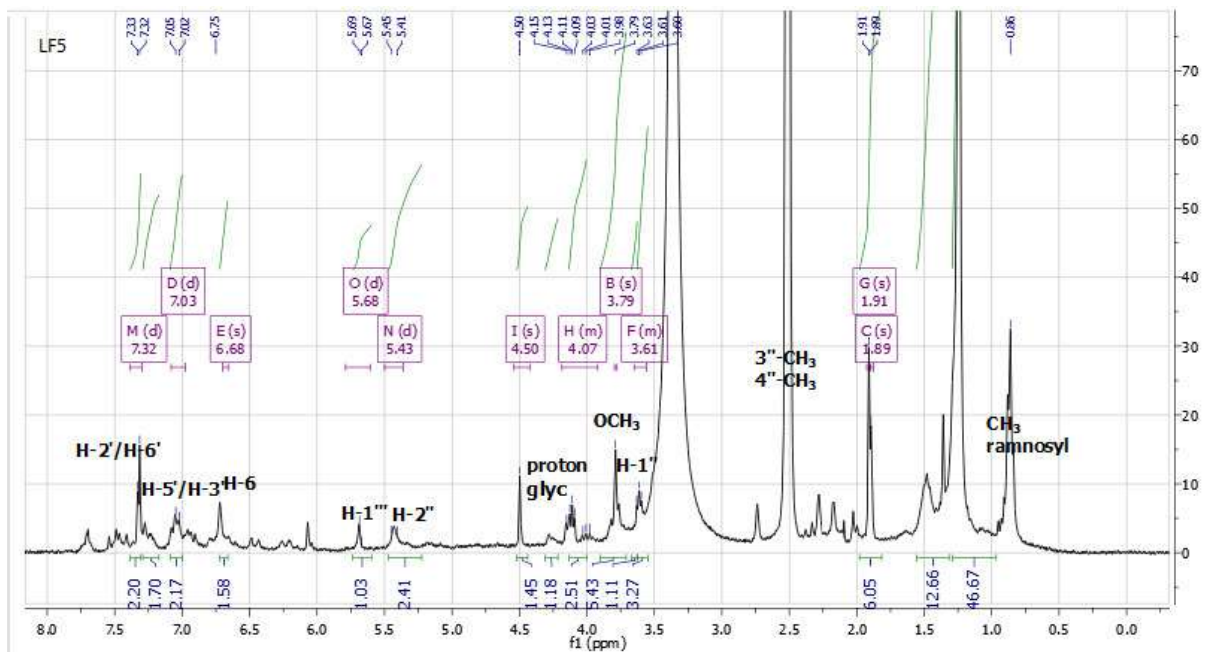
La spectroscopie d'absorption infrarouge ((Annexe 5) montre la présence de la fonction OH par l'existence de bandes caractéristiques à  $3404.55\text{ cm}^{-1}$ . Les vibrations d'élongations à  $2923.82$  et  $2847.34\text{ cm}^{-1}$  confirment la présence d'un groupement méthyle et méthylène . Une bande à  $\nu = 1716.75\text{ cm}^{-1}$ , caractérisant la fonction carbonyle . Aussi l'absorption vers  $\nu = 1612\text{ cm}^{-1}$  ,  $\nu = 1510\text{ cm}^{-1}$  attribuable à la fonction C=C aromatique et aliphatique . Nous remarquons la présence de vibration de déformation de la liaison OH à  $\nu = 1459\text{ cm}^{-1}$  , Les bandes à  $\nu = 1383.31\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1219\text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ; Le reste des bandes peut être attribué à la déformation , l'une à  $\nu = 1459\text{ cm}^{-1}$  attribué à la liaison OH , les autre bandes à  $\nu = 1383.31\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1219\text{ cm}^{-1}$  attribuable à la déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques . Des bandes à  $\delta=985\text{ cm}^{-1}$ ,  $694\text{ cm}^{-1}$  et  $\delta=745\text{ cm}^{-1}$ : Déformation des liaisons C=C-H .

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), indique la présence d'un signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ppm (s, 1H) correspondent aux protons aromatiques du cycle A (H-6), ainsi que deux signaux dans la région propre aux protons aromatiques. On remarque deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  7,03 et 7,32 ppm , chacun intégrant pour 2H, avec une constante de couplage  $J=9.00\text{ Hz}$ , qui ne peut être positionné que sur le cycle B en position (H-3' / H-5' ) et (H-2' / H-6') respectivement . En effet, on remarque la présence des multiplets à la région  $\delta_{\text{H}}$  3,79 et 4,50 ppm

correspondent aux protons ramoside et glucoside .On note la présence d'un groupement méthoxyle ( $\delta_H$  3,79 ppm) . Les signaux à  $\delta_H$  5,43 ppm (m, 1H),  $\delta_H$  3,61 ppm (2H, m) ,  $\delta_H$  1,89 (s, 3H) et 1,91 (s, 3H) appartiennent à une prénylation de type 3,3 -DMA . Enfin, le doublet à  $\delta_H$  0,86 ppm correspond au  $CH_3$  du ramoside , et la comparaison avec les données de la littérature (ZHANG Y *et al.*, 2012 ; QINGGANG *et al.*, 2015 ; ) permettent d'identifier ce composé comme étant la 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside ou Icariin (BRUNO *al.*, 2005; XIN JIN *al.*, 2012 ) .



**Figure 4.13** Structures proposées du composé LF5, la 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin)



**Figure 4.14** Spectre RMN <sup>1</sup>H de LF5 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Tableau 4.6:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H de **LF5** dans CDCl<sub>3</sub>.

RMN <sup>1</sup> H			
Position	δ 1H (ppm)	m	J (Hz)
H-6	6,68	s	—
H-3'	7,03	d	9.00
H-5'	7,03	d	9.00
H-6'	7,23	d	9.00
H-2'	7,23	d	9.00
1''	4,50	m	—
2'',3'',4'',5'',6''	3,79 et 4,50	m	9.8
1'''	5,68	d	7,4
2''',3''',4''',5'''	3,79 et 4,50	m	—
CH <sub>3</sub> rhamnose	0.86	d	8.50

#### 4.2.6 Elucidation structurale du composé LF6

Le composé **LF6** a été isolé sous forme d'une poudre de couleur jaune à partir de l'extrait par l'acétate d'éthyle des feuilles (LFf2). Son spectre UV présente deux maxima à 271, 336 nm.

La spectroscopie d'absorption infrarouge (Annexe 6) montre la présence de la fonction OH par l'existence de bandes caractéristiques à 3404. Une bande à  $\nu = 1771 \text{ cm}^{-1}$ , caractérisant la fonction carbonyle. Deux bandes attribuables à la fonction C=C aromatique et aliphatique à  $\nu = 1683 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu = 1612 \text{ cm}^{-1}$  respectivement. ainsi, Une bande à  $\nu = 1459 \text{ cm}^{-1}$ : déformation de la liaison OH.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) présente les résonances entre  $\delta_{\text{H}}$  6.24, 6.41 et  $\delta_{\text{H}}$  6.61 ppm montrent les protons H-3, H-6 et H-8, ainsi que la présence de deux signaux intégrants pour deux protons chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6,94 et  $\delta_{\text{H}}$  7,37 ppm présentant la même constante de couplage ( $J = 8,7 \text{ Hz}$ ) est caractéristique de la présence de quatre protons en position 2', 3', 5' et 6' sur un cycle aromatique B. Enfin, le singulet à  $\delta_{\text{H}}$  3,80 ppm correspond au groupement méthoxy intégrant pour 3H. Les données de RMN <sup>1</sup>H qui correspondent à celles de la littérature, permettent de proposer la structure possible du composé LF6 comme la 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou Genkwanine (KAYOKO & NOBUJI, 2014).



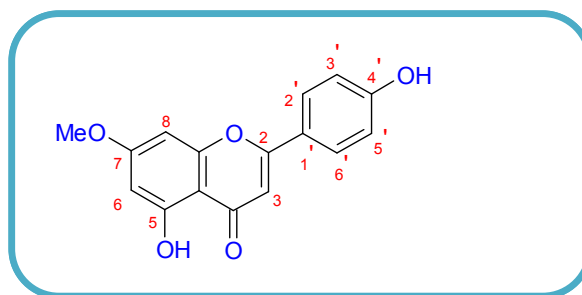


Figure 4.15 Structures proposées du composé LF6, la 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine)

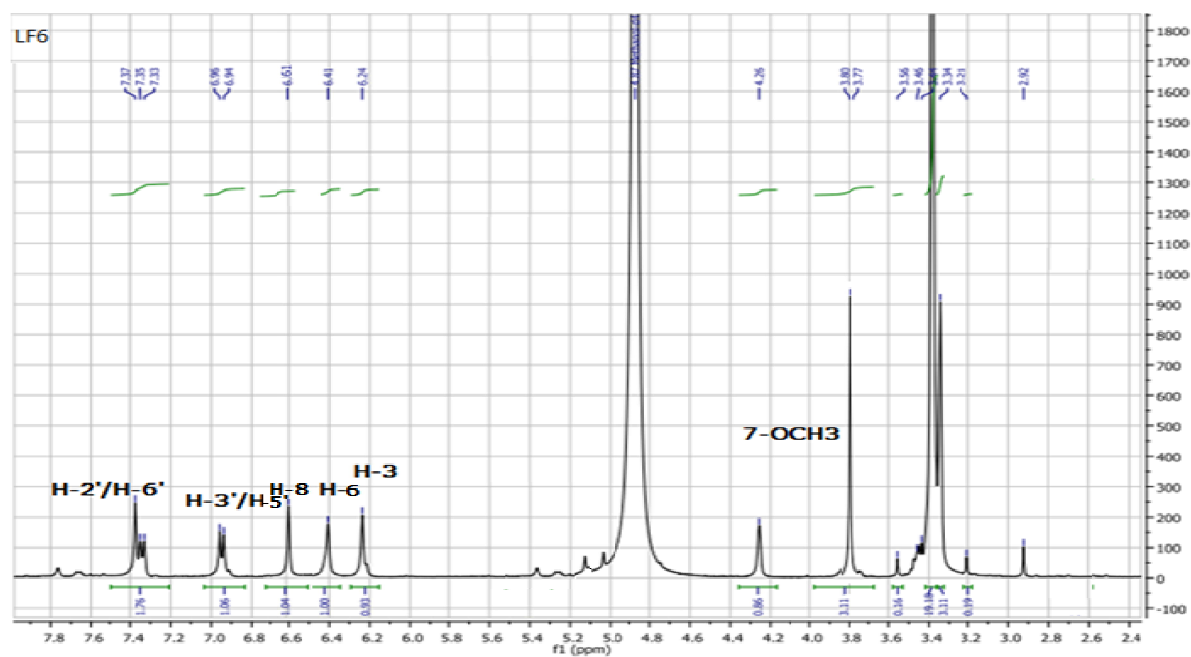


Figure 4.16 Spectre RMN  $^1\text{H}$  de LF6 (300 MHz, DMSO- $d_6$ )

Tableau 4.7 : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  de LF6 dans DMSO- $d_6$ .

RMN $^1\text{H}$			
Position	$\delta$ 1H (ppm)	m	J (Hz)
H-3	6,24	s	—
H-8	6,41	s	—
H-6	6,61	s	—
H-2'	7.37	d	8.70
H-3'	6,94	d	8.70
H-5'	6,94	d	8.70
H-6'	7.37	d	8.70
3'-OMe	3.84	s	—

### 4.3 Activités biologiques

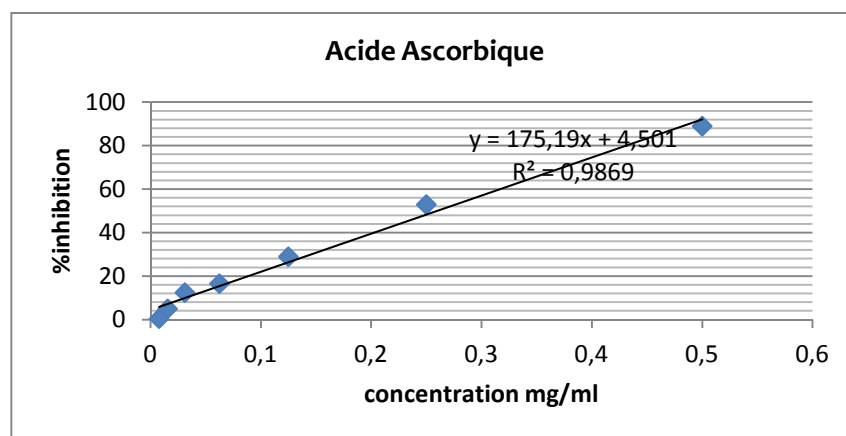
Notre travail a porté sur la recherche des activités biologiques des extraits bruts (extrait aqueux , Extrait hydro-acétonique ),l'extrait butanolique (Lff3) , Fraction d'acétate d'éthyle (Lff2) et fraction éther d'éthylrique ( Lff1) et des trois flavonoïdes isolé ( FLAV11 FLAV12 et FLAV13 de la partie feuille de *Limoniastrum feei* . Nous avons dépisté les activités, anti-inflammatoires et antioxydants des différents extraits. Pour l'interprétation des résultats, nous avons pris en compte ceux de certaines études antérieures.

Le choix des feuilles et des activités citées est lié au fait que cette partie de la plante est traditionnellement utilisée pour traiter les affections courantes et particulièrement traiter la bronchite et les infections intestinale.

#### 4.3.1 Activité antioxydant

La figure 4.17 représente la capacité antioxydant, exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH\* , d'un témoin positif antioxydant, l'acides ascorbique , de l'extrait aqueux ,extrait hydro-acétonique et des trois fractions simplifiées de cet extrait et des flavonoïdes isolé de la partie feuille de *L. feei* . L'extrait et les fractions ont été évaporés à sec puis lyophilisé et remis en solution dans MeOH à une même concentration de 1 mg/ml.

La valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique que nous avons trouvée (0.22 mg/ml) (Figure 4.15) , est proche des valeurs d'IC<sub>50</sub> trouvées par CONFORTI *et al.*,2008 de l'ordre de 0.20 mg/ml) et EL-HACI , (2009 ) de l'ordre de 0,27mg/ml).



**Figure 4.17** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique.

Les profils de l'activité antioxydant obtenus révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante .L'extrait d'acétate d'éthyle LFF2 de l'espèce *L. feei* a montré un pouvoir réducteur plus important par rapport aux autres extraits. A une concentration de 0.28 mg/ml, il a atteint un pourcentage d'inhibition égale à 87.65%, suivi par les autres extraits aqueux (85,23 %) et l'acétone (80,64%). alors que les extraits butanolique et étherique n'ont atteint que 78.54% et 68.77% .

Indépendamment de la nature du solvant, la comparaison des profils de l'activité antioxydant des différents extrait d'*L. feei* a permis de distinguer que les extraits aqueux et acétate d'éthyle présentent des pourcentages significativement plus importants.

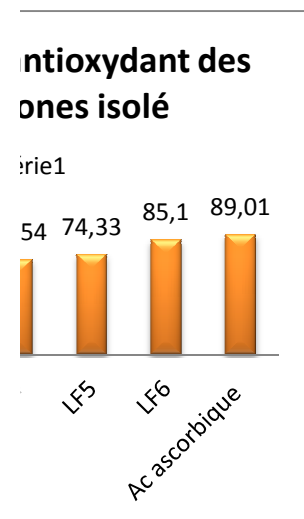
Du tableau 4.8, nous remarquons le fort pouvoir antioxydant des flavonoïdes isolé par rapport au contrôle positif utilisé . Des valeurs très comparables à celle de antioxydant de référence utilisé.

**Tableau 4.8** Activité antioxydant (%) et valeurs des IC<sub>50</sub> (concentration finale ) trouvées pour les différentes fractions, les extraits bruts et les trois flavonoïdes isolé de la partie feuille de *L. feei*.

Extrait	Test de DPPH	
	AA%	IC <sub>50</sub> mg/ml
Extrait aqueux	85,23 ± 0,26	0,29 ± 0,1
Extrait acétonique	80,64 ± 0,21	0,30 ± 0,79
LFF2	87,65 ± 0,21	0,28 ± 0,54
LFF3	78,54 ± 0,19	0,34 ± 0,47
LFF1	68,77 ± 0,11	0,9 ± 0,47
LF1	42,72 ± 0,05	0,63 ± 0,19
LF2	48,62 ± 0,09	0,44 ± 0,32
LF3	72,20 ± 0,12	0,31 ± 0,12
LF4	70,54 ± 0,03	0,33 ± 0,19
LF5	74,62 ± 0,05	0,50 ± 0,32
LF6	84,9 ± 1,3	0,29 ± 0,10
Acide Ascorbique	89,01 ± 0,001	0,22 ± 0,09

Le LF6 représente le flavone le plus actif avec une IC 50 de l'ordre de 0,29 mg/ml suivi par LF5 avec une IC 50 de 0.50 mg/ml. Les flavones LF3, leur activités antioxydant est très intéressantes avec de valeur comprises entre 72,20%. Ces valeurs sont plus importantes que celle de l'acide ascorbique (89,01%).

Les valeurs des CI50, présentées dans le tableau 4.8, nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la CI50 est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres. Deux groupes peuvent ainsi être distingués : un premier ayant des valeurs supérieures ou égales à 0.44 mg/ml (c'est le cas de LF2, LF1 et l'extraits d'éthyle éther), et un deuxième groupe ayant des valeurs inférieures ou égales à 0.34 mg/ml (c'est le cas de l'extrait hydro-acétonique, l'extrait d'acétate d'éthyle). On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs.



es positif Acide ascorbique, les  
rait butanol et LF3 :l'extrait  
5,LF6 et de contrôles positif

**Figure 4.18** profile de l'activité antioxydant (%) au test DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits de la partie feuille de *L. feei* a été effectuée par la méthodes du piégeage du radical libre DPPH\*, afin de tester ces extraits par rapport aux différents mécanismes réactionnels qu'impliquent ce test antioxydant. Il est à préciser que dans la littérature, très peu d'études ont rapporté l'activité antioxydante de cette plante. Néanmoins, l'étude faite par Chaabi et al. (2008) a rapporté un pouvoir antioxydant considérable de cette plante testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH\*. Ce pouvoir a été attribué à la présence dans cette espèce de certains polyphénols et

flavonoïdes tels que l'acide gallique, la quercétine, la myricétine et l'épigallocatechine gallate (CHAABI *et al.*, 2008). La présence de tels composés dans un extrait de plante lui confère un pouvoir antioxydant important (RICE-EVANS *et al.*, 1996 ; HARBORNE *et WILLIAMS*, 2000 ; MARIN *et al.*, 2002 ; MONTORO *et al.*, 2006 ; OTHMAN *et al.*, 2007 ; SHAN *et al.*, 2007).

El-Haci Imad (2014 ) rapportent une modeste activité antioxydant des extraits organiques de *Limoniastrum feei* testée par plusieurs méthodes antioxydants. A titre indicatif, les valeurs de la CI 50 trouvées pour l'extrait éthanolique et méthanolique pour la partie feuille été de l'ordre de (3.2 µg/mL) et ainsi que pour l'extrait acétonique (7 µg/mL) , alors que la valeur de la CI 50 pour l'acide ascorbique était de l'ordre de 1.98 µg/mL, et ce dans le cas du test du piégeage du radical libre DPPH\* .

Dans notre étude, nous avons constaté une activité antioxydante remarquable des extraits : aqueux , et acétonique et ce dans le test du piégeage du radical libre DPPH\* , des valeurs très importantes de la CI 50 ont été enregistrées pour les extraits ; aqueux (0.29mg/mL) ainsi que pour l'extrait acétonique (0.30mg/mL). Pour les extraits (LFf2,LFf1,LFf3) ont donné des CI 50 importantes par rapport au l'antioxydant de référence, Cette intéressante activité antioxydante que renferme cette plante via ces extraits polaires peut être expliquée par la nature des constituants que renferment ces extraits organiques. La polarité de ces solvants leur confère un pouvoir extractant important vis-à-vis des molécules polaires actives, telles que certains composés phénoliques (EL-HACI IMAD ,2014 ) . L'extrait acétonique de *L. feei* a exercé un effet antioxydant assez remarquable par rapport aux autres extraits. Ce type d'extrait (à l'acétone) est le plus souvent employé pour l'extraction de molécules actives (BELBOUKHARI *et CHERITI*, 2007 ; YESILYURT *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus pour l'ensemble des flavonoides isolé (LF1, LF2, LF3 , LF4, LF5) de *L. feei* ont exercé un effet antioxydant comparable à celui des antioxydants de référence sauf pour LF6 qui a révélé une remarquable activité antioxydante dans cette méthode.

Pour ce qui concerne la relation structure activité, L'identification par RMN ,UV IR a permis de caractériser six molécules, sont des dérivés de flavonols et flavone . Parmi ces composés, il a pu être identifié les flavonols aglycones ainsi que polymethoxy flavone .

Les flavonoïdes, molécules ubiquitaires du règne végétal, sont avec les vitamines (B et E) et les caroténoïdes, les antioxydants majeurs des végétaux, contribuant ainsi à

l'effet bénéfique sur la santé humaine de la consommation régulière d'aliments d'origine végétale (JONES *et al.*,2006 ; MEOT-DUROS *et al.*,2010 ). Cet effet est notamment dû à leur capacité à inhiber des enzymes responsables de la production des ERO mais aussi à leur capacité à piéger ou à stabiliser les radicaux libres (JONES *et al.*,2006). La présence de ces molécules dans l'extrait de *L.feei* justifie notre démarche d'évaluation des propriétés antioxydantes, via de test du piégeage du radical libre DPPH', de nos fractions plus ou moins enrichies en ces molécules.

D'après Rice-Evans *et al.* (MEOT-DUROS *et al.*,2010 ), pour obtenir une activité antioxydante maximale les flavonoïdes doivent comporter une:

- structure ortho-diphénolique (noyau catéchol) sur le noyau B
- une double liaison entre le C 2 et le C 3 , qui est en conjugaison avec la cétone du C 4
- des groupements hydroxyles en position 3 et 5

Par ailleurs, les méthylations et glycosylations des flavonoïdes réduisent leur activité par rapport à leur aglycone correspondant. En considérant ces critères structuraux, la quercétine est le flavonol type qui doit posséder une forte capacité antioxydante, ce qui a d'ailleurs été confirmé dans plusieurs études et notamment obtenu à partir de feuille de *Limoniastrum feei* (CHAABI *et al.*,2008). De plus, toutes les fractions testées sont composées de plusieurs molécules ce qui peut induire des effets antagonistes ou synergiques sur l'activité antioxydante. Ainsi deux ou plusieurs molécules différentes peuvent soit agir sur la même cible et la compétition qui en résulte a un effet néfaste sur l'activité, soit elles agissent sur des cibles différentes et l'action combinée des effets induit une diminution de l'activité.

Cependant, il nous manque ici des données structurales pour établir une relation entre la forte activité antioxydante observé et la structure chimique des composés.

### 4.3.2 Toxicité aiguë par voie intra-péritonéale

Les études ont été réalisées avec tous les extraits (extrait aqueux , acétonique) avec les fractions (Lff2, Lff3) mais la fraction Lff1 non traitée qui n'est pas soluble dans l'eau physiologique et a une très faible solubilité dans le tween 40 . L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses qui sont,

immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée (LEBLANC, 2010).

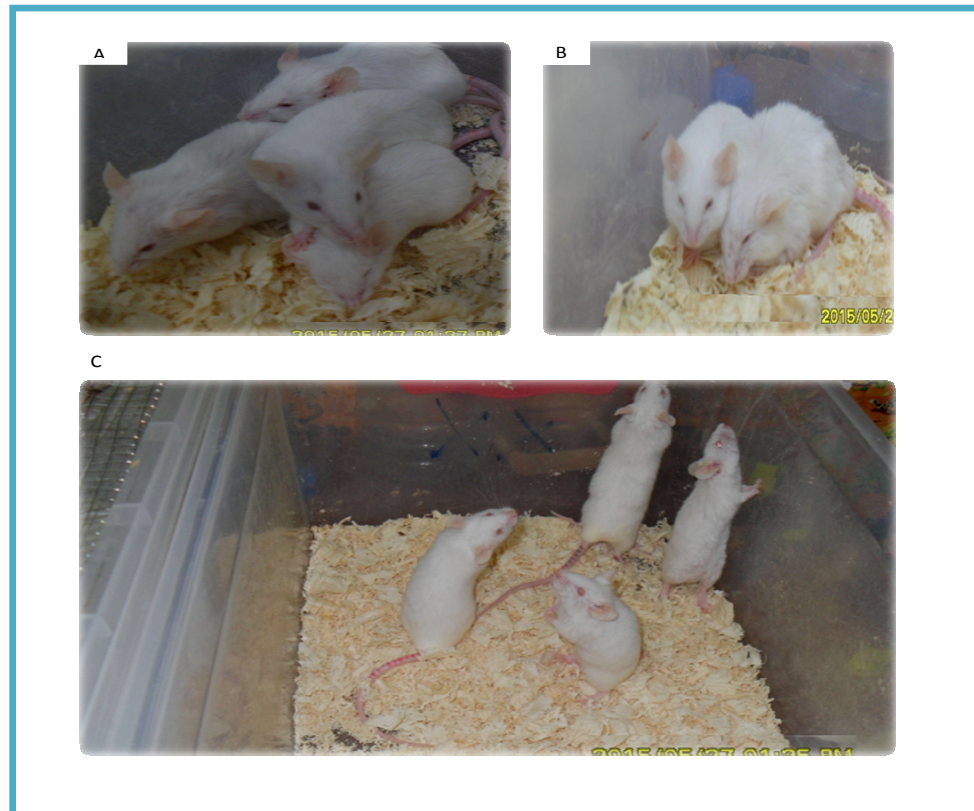
#### 4.3.2.1 Observations cliniques et de survie

Les signes cliniques et de mortalité apparus chez les souris de chaque groupe ont été suivis continuellement pendant une heure après l'administration intra-péritonéale de l'extrait aqueux de feuilles de *Limoniastrum feei* ou avec des fractions (LFf2, LFf3). Cette observation a été étendue le long de la durée d'étude de la toxicité aiguë (24 jours), pour déceler les effets retardés de l'extrait ou/et flavonoïdes étudié. La prise des différentes doses de produit étudié la partie aérienne de *Limoniastrum feei*, par voie intra-péritonéale, a provoquée des changements plus ou moins graves dans l'activité physique et le comportement des souris qui peuvent aller jusqu'à la mort. Le tableau 4.9 résume l'ensemble des troubles enregistrés au cours de cette expérience.

**Tableau 4.9** L'effet toxique par voie intra-péritonéale des l'extraits étudié de *Limoniastrum feei* sur le comportement des animaux et le taux de mortalité.

L'extrait	Dose mg/kg	Mort D /T	Signe de toxicité	Latence h /min
Eau physiologique	0	0/3	Normal	-
Extrais aqueux	25	0/3	Normal	-
	100	1/3	Hypoactivité, somnolence	48h
	150	3/3	Hypoactivité, isolement, somnolence, anorexie, Tachycardie.	2h
Extrais acétonique	50	0/3	Normal	-
	100	1/3	Somnolence, anorexie, hypoactivité, isolement, Tachycardie	48h
LFf2	50	0/3	Normal.	-
	100	1/3	Somnolence, anorexie, hypoactivité, isolement, Tachycardie	48 h
LFf3	50	0/3	Normal.	-
	100	0/3	Normal.	-

T : totale ; D : décès ; h : heure ; min : minute



**Figure 4.19** L'effet toxique des 'extraits sur le comportement des animaux. A : hypoactivité des animaux, B : somnolence, C : activité des animaux témoins.

L'administration par voie intra-péritonéale de l'extrait aqueux de *Limoniastrum feei* à la dose de 100 mg/kg PC a provoqué la mort d'une souris après 48 h. Ce résultat n'est pas significatif statistiquement au seuil de 5% et reste à vérifier sur un plus grand nombre d'animaux. En outre l'observation, pendant 48 h après l'administration de l'extrait aqueux de 50 mg/kg PC, n'a pas montré d'effets remarquables sur le Comportement général et la respiration des souris. Pour les concentrations élevées (150 mg/kg PC), nous avons observé une tachycardie Hypoactivité, isolement, somnolence et anorexie (figure 4.19) chez toutes les souris de ce groupe durant les deux premières heures suivant l'administration.

Suite à l'administration par voie intra-péritonéale d extraits acétonique et Lf2 à fortes doses (100 mg/kg PC), montrent des changements de comportements et des signes d'intoxication plus ou moins graves (bradycardie, difficulté de respiration, tremblements, etc.) et entrent dans un état narcotique avec des périodes d'excitation occasionnelles ce qui conduit, finalement, à leur mort .

Le lot contrôle (0 mg/Kg) contenant les souris administrés par l'eau physiologique n'a montré aucun signe clinique. L'administration de l'extrait acétonique de 50 mg/kg PC et



100 mg/kg PC; n'a pas montre d'effets remarquables sur le Comportement général et la respiration des souris.

nous avons administré par voie intra-péritonéale chez le groupe des souris une dose déterminée des extraits testé . Les doses étaient 50mg/kg PC, du l'extrait acétonique et LFf2 . Le dernier lot a été administré avec 100mg/kg PC du la fraction LFf3 . Les doses à été choisie ,car elle ne présente aucune toxicité.

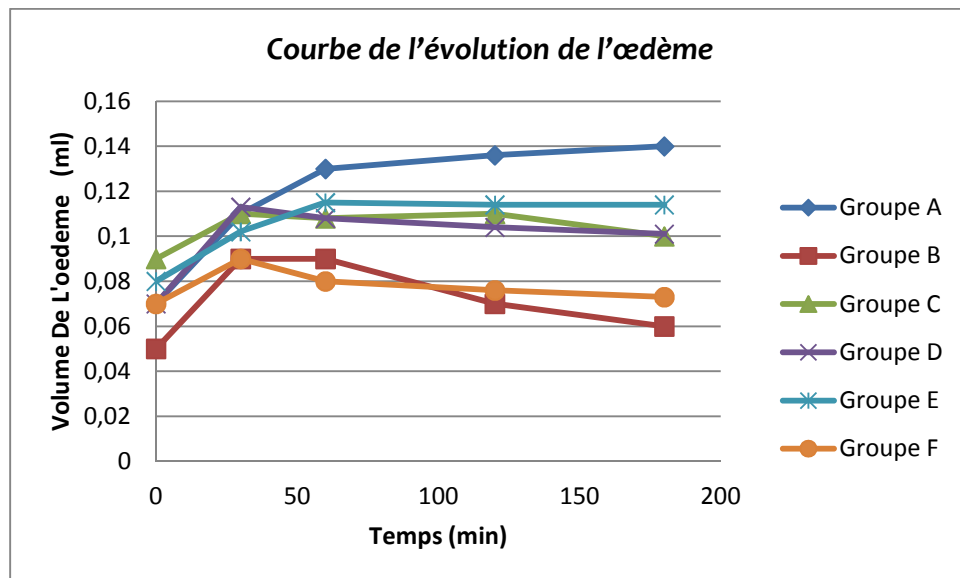
#### 4.3.2 Activité Anti-inflammatoire

Notre étude a été conçue pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des feuilles de la plante L-feei , Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par le formol à 1%. Nous avons testé sur ce modèle les extraits aqueux, à la dose de (25 mg/kg PC ), acétonique à la dose de (50mg /kg PC) , L'extrait d'acétate d'éthyle à la dose (50mg /kg PC) et l'extrait butanolique à la dose (100 mg/ kg PC ) en administration par intra-péritonéale. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de le médicament diclofénac, est un anti-inflammatoires non stéroïdiens et à ceux du contrôle physiologique.

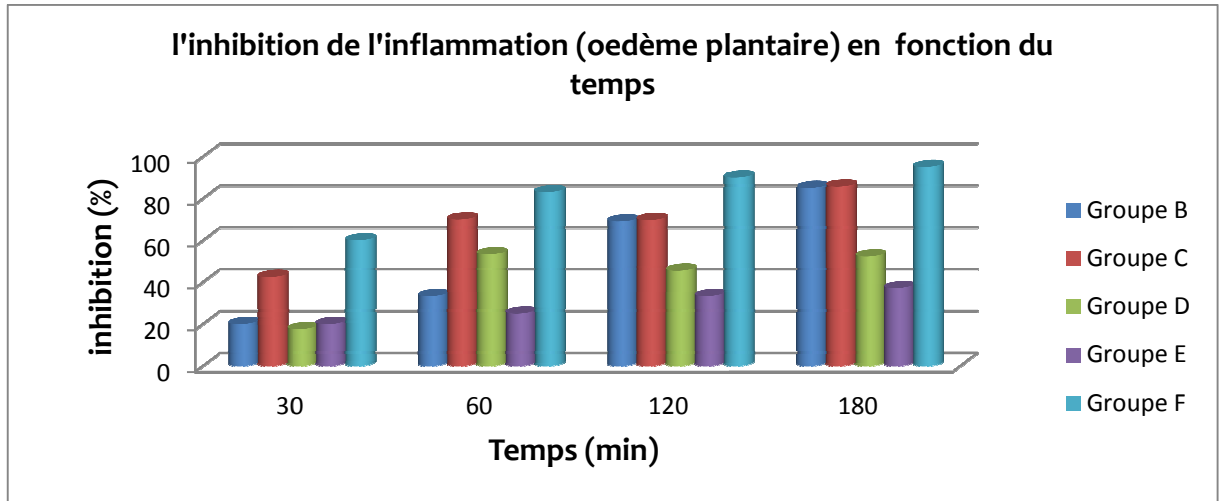
**Tableau 4.10** Effet des extraits étudié et diclofénac sur l'œdème plantaire induit par la formole chez les souris

Traitement	Dose	Temps (min) et volume de l'œdème (ml)				
		0	30	60	120	180
Sérum physiologique	0	0,07±0,01	0,11±0,005	0,13±0,01	0,136±0,01	0,14±0,02
Extrait aqueux	25mg /kg	0,05±0,01	0,09±0,02 (20 %)	0,09±0,011 (33.33 %)	0,07±0,01 (69 %)	0,06±0,01 (85 %)
Extrait acétonique	50mg /kg	0,09±0,01	0,110±0,049 (42,50 %)	0,108±0,04 5 (70 %)	0,110±0,05 (69,69 %)	0,100±0,025 (85,71 %)
LFf2	50mg /kg	0,08±0,015	0,113 ±0,015 (17,50 %)	0,108±0,02 6 (53,33 %)	0,104±0,015 (45,45 %)	0,101±0,015 (52,27 %)
LFf3	100mg /k g	0,07±0,032	0,102±0,015 (20 %)	0,115±0,015 (25 %)	0,114±0,017 ( 33,33 %)	0,114±0,02 (37,14 %)
Médicament (diclofénac)	25mg /kg	0,07±0,01	0,09±0,02 (60 %)	0,08±0,01 (83 %)	0,076±0,005 (90 %)	0,073±0,005 (95 %)

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus ont été comparés à ceux du diclofénac et à ceux du contrôle ayant reçu le sérum physiologique. L'évolution de l'inflammation pour les différents produits est représentée par la Figure 4.20. Nous constatons que l'inflammation causée par le formol augmente en fonction du temps et atteint un maximum (94 %) à 180 min Figure 4.20. L'administration du diclofénac (25 mg/Kg PC) provient de façon significative l'évolution de l'inflammation au niveau plantaire de la patte du souris à 60 min et à 180 min après l'administration du formol (respectivement  $0,08 \pm 0,01$  % et de  $0,073 \pm 0,005$  %) l'administration de l'extrait aqueux de *Limoniastrum feei* au (25 mg/Kg PC) prévient de façon significative ( $p < 0,05$ ) l'œdème plantaire chez le souris à partir de la premier heurs du traitement . le traitement avec ce dose provoque un effet inhibiteur de l'inflammation important et significativement différent du contrôle ayant reçu le sérum physiologique et qui persiste au bout de 180 min après l'injection de la formol. L'extrait acétonique au dose (50 mg/Kg PC) montre un pourcentage d'inhibition de  $85,71 \pm 0,025$ % significativement différent du groupe traité par le sérum physiologique (tableau 4.10).



**Figure 4.20** Evolution de l'inflammation (œdème plantaire) en fonction du temps pour les différents groupes ; groupe A : témoin traité avec le sérum physiologique (10 ml/Kg PC) ; Groupe B : traité avec l'extrait aqueux (25 mg /Kg PC) ; Groupe C : traité avec l'extrait acétonique (50 mg /Kg PC) ; Groupe D : traité avec l'extrait d'acétate d'éthyle LFF2 (50 mg /Kg PC) ; Groupe E : traité avec l'extrait butanolique LFF3 (100 mg /Kg PC) ; Groupe F : traité avec diclofénac (25 mg /Kg PC) ;



**Figure 4.21** Inhibition de l'œdème chez les différents lots de souris ,en présence d'un prétraitement ,par voie ip, Groupe B : traité avec l'extrait aqueux (25 mg /Kg PC) ; Groupe C : traité avec l'extrait acétonique (50 mg /Kg PC) ; Groupe D : traité avec l'extrait d'acétate d'éthyle LFF2 (50 mg /Kg PC) ; Groupe E : traité avec l'extrait butanolique LFF3 (100 mg /Kg PC) ; Groupe F : traité avec diclofénac (25 mg /Kg PC) ;

La dose de 50 mg/kg de FAE de *Limoniastrum feei* a montré un pourcentage d'inhibition de la douleur de 52,27% chez les souris. Extrait acétonique au dose (100 mg/Kg PC) de *Limoniastrum feei* administré dans les mêmes conditions que précédemment, réduit aussi considérablement l'œdème (Figure 4.20 et Tableau 4.21). l'extrait acétonique de feuilles de *Limoniastrum feei* est plus efficace que l'extrait aqueux dans la prévention de l'œdème aigu de la patte de souris (Tableau 4.10).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que ces produits possède une activité anti-inflammatoire (Tableau 4.10). Des études ont montré que plusieurs espèce de la famille plumbaginacée telle que *Plumbago zeylanica* , *Limonium densiflorum* développent une activité anti- inflammatoire in vivo (SHEEJ *et al* ,.2010 ; MEDINI *et al.*; 2010 ).

Dans nos conditions expérimentales le formol a provoqué l'œdème dont le volume est maximal au bout de deux heures (SINGLA *et al.*, 1990; IVANOVSKA *et al.*,1997) ; VIANA *et al.*, 1998). Le formaldéhyde provoque l'inflammation locale lorsqu'il est injecté dans l'aponévrose de la plante du pied (SEN & NAG, 1991; SINGH *et al*, 1997 ;Suzuki *et al.*, 1996) tout comme la carragénine (BHATT *et al.*, 1977; OSSIPOV *et al.*,1995). La cause de cette réaction inflammatoire est la lésion tissulaire. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes (AMMON *et al.*, 1993 ; AGBONON *et al.*,2001 ), du PAF (facteur

d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO monoxyde d'azote) et du TNF (facteur de nécrose tumorale) (CLARKE *et al.*,1996).

Les effets de feuille de *Limoniastrum Feei* sur l'œdème s'expliqueraient par l'inhibition de la synthèse des substances pro-inflammatoires comme les cytokines et les prostaglandines. Nos résultats nous feraient penser que l'extrait aqueux de feuilles de *Limoniastrum Feei* inhiberait de médiateurs de l'inflammation surtout la production des prostaglandines comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofenac) utilisés comme médicaments de référence dans nos tests. La richesse de l'extrait aqueux de *Limoniastrum Feei* en constituants polyphénoliques capables de piéger les radicaux libres, empêcherait la formation des prostaglandines qui provoquent l'inflammation. Les substances polyphénoliques du l'extrait aqueux de feuilles de *Limoniastrum Feei* pourraient en partie expliquer ces activités.

La littérature attribue aux flavonoïdes (myricetin-3- O-rhamnoside, epigallocatechine, epicatechine; catechine, quercetine , 6,3',4'-tri-methoxy 3,5,5'-trihydroxy flavonol, 3-(6''-malonyl 2''-ramnosyl glucosyl) 6,3',4'-trimethoxy 5,5'-dihydroxy flavonol, tetraacetate 7-dihydroxy-4'-methoxy 8-O-β-glucopyranoside isoflavone et tetraacetate 7,4'dimethoxy 8-O-β-glucopyranoside isoflavone) (BELBOUKHARI CHERITI, 2007 ; CHAABI *et al.*,2008 ; BOUDERMINE *et al.*, 2014 ) aux acides phénols ( acide gallique), aux dérive acétophénone 3,4- dihydroxyphenylthanol-8'-O-β-D-(6-sulpho)- glucopyranoside ; salidroside ,myrciaphenone A (BOUDERMINE *et al.*, 2014 ) doués de propriétés antioxydante et anti-inflammatoire.

Pour ce qui concerne la relation structure activité, Nous n'avons pas trouvé le mécanisme exact d'inhibition de l'inflammation par le flavonoides isolés dans la littérature. Toutefois, nous avons donc tenté de réaliser une hypothèse sur son mode d'action d'après nos connaissances . l'activité antioxydant dépendait par la présence de la double liaison en C2-C3 C'est le cas de flavone , depuis de la forme plan de la squelette de flavone et de la disposition spatiale des flavanone qui, son rotation conduit à une structure différente, qui avoir différents effets sur les enzymes pro-inflammatoires (BAS *et al.* 2006).

Les recherches faites par LANDOLFI *et al* ont montré que beaucoup de flavonoides étudiés étaient capables de modifier le métabolisme d'acide arachidonique dans les plaquettes pour donner la prostaglandine et le leucotriènes induisant des phénomènes inflammatoires. Ce groupe a aussi montré que quelques flavonoides tels que la

myricétine et la quercétine bloquent la cyclooxygénase et la lipooxygénase avec une forte concentration de ces deux flavonoides, en outre d'autres flavonoides tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (LANDOLFI et al.,1983)

L'activité anti-oxydante de l'extrait aqueux de *Limoniastrum Feei* est donc un atout supplémentaire pour son utilisation comme médicament anti-inflammatoire. Les propriétés pharmacologique des feuille de *Limoniastrum Feei* révélées dans ce travail, justifient leur application dans la phytothérapie traditionnelle et pourraient indiquer la possibilité de leur usage thérapeutique comme antioxydant et anti-inflammatoire .

#### 4.4 Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Limoniastrum feei* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de six composés purs. Il s'agit du :

- 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5 , 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol
- 3',5 hydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol
- 6, 7, 8,3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone
- 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin)
- 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone
- 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine).

L'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Limoniastrum feei* ont été évalués dans ce travail . les résultats obtenus montrent que les extraits ont une activité anti-inflammatoire et antioxydante. Cependant, cette activité est différente selon le degré de solubilité des composés secondaires de *Limoniastrum feei* .



# *Conclusion*



## CONCLUSION GÉNÉRALE



Le travail constitue une contribution à la valorisation de la flore endémique locale par le biais de l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques des substances extraites de ces plantes.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier les activités biologiques des extraits organiques d'une des plantes endémiques du Sahara Algérien : *L. feei*, en évaluant son pouvoir antioxydant par tests de DPPH ainsi que son activité anti-inflammatoire et la toxicité de quelques extraits testée in vivo.

L'étude bibliographique préalable réalisée sur cette espèce a montré qu'il n'existe pas beaucoup d'informations de nature chimique et/ou biologique sur cette espèce. Cependant, au cours de nos travaux, nous avons séparé à partir de cette espèce six produits purs, parmi lesquels à savoir deux composés des rameaux, un seul composé de la partie des tiges et trois composés de la partie feuille. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques. La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie IR et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

Ces démarches nous a conduit à l'isolement et à l'identification des métabolites secondaires appartenant de la classe des flavonoides :

- 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5, 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol
- 3', 5 hydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol
- 6, 7, 8,3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone
- 4'-O-methyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin)
- 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone
- 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine).

---

L'effet anti-inflammatoire et antioxydant de l'extraits aqueux et les six produit isolé de *Limoniastrum Feei* ont été évalués dans ce travail. Les résultats obtenus montrent que l'extraits aqueux ont une activité anti-inflammatoire et antioxydante. Cependant, cette activité est différente selon le degré de solubilité des composés secondaires de *Limoniastrum Feei*

In vivo, l'extrait aqueux ,extrait acétonique et l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles montrent une activité anti-inflammatoire importante par rapport a l'extrait aqueux des feuilles. En effet, lors du test d'inhibition du développement de l'œdème de l'œdème par le formol chez la souris permet de conclure que (extrait acétonique et l'extrait d'acétate d'éthyle , l'extrait butanolique) et l'extrait aqueux des feuilles de *Limoniastrum Feei* administré par voie intra-péritonéale possèdent un effet anti-inflammatoire significativement important à celui de diclofénace, alors que l'extrait butanolique un effet anti-inflammatoire moins important que les deux extrait (acétonique , l'extrait d'acétate d'éthyle ) aux doses utilisées.

Les tests antioxydants in vitro montrent aussi que les extraits (extrait acétonique et l'extrait d'acétate d'éthyle , l'extrait butanolique) et l'extrait aqueux ont une activité antioxydante vis-à-vis le radical DPPH.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de extrait aqueux et les extrait organique de *Limoniastrum feei* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverse affections inflammatoires.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans l'extraits aqueux de *Limoniastrum feei* et l'évaluation leurs effets sur les de signalisations impliqués dans le processus inflammatoire.





*Référence*  
*Bibliographique*



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABENA AA, OUANBA JM, KEITA A** Activité anti-inflammatoire analgésique et antipyrétique de l'huile essentielle d'*Agératum conyzoides*. Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine, IX éd, 1997, 48–55.
- AGBONON, A., AKLIKOKOU, K., AKPAGANA, K., ET GBEASSOR, M.** Etude des propriétés anti-inflammatoires de la racine de *pluchea o valls* (pers.) Dc. (asteraceae) chez le rat. Pharm. Méd. Trad. Afr. 2001, VoU 1, pp. 1-11
- AGRAWAL. P.K.**..Carbone -13 NMR of flavonoids. Elsevier USA. Vol 39, 2013, 581 pages
- AHMED K. M., KANDIL F. L., MABRY T.J.,** An anticancer tannin and other phenolics from *Limonium axillare* (Plumbaginaceae).Asian J Chem, 1999, 11(1): 261-63
- ALI ESMAIL AL-SNAFI** The Pharmacological Importance Of *Brassica Nigra* And *Brassica Rapa* Grown In Iraq . Journal of Pharmaceutical Biology, 5(4), 2015, 240-253.
- AMELIE, L.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches *agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* Baker (ericaceae), *tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *mbelia concinna* baker (myrsinaceae), Thèse de Doctorat, Institute National Polytechnique De Toulouse ,2007.
- AMEZOUAR F., BADRI W., HSAINE M., BOURHIM N., FOUGRACH H.,**Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. . Pathologie Biologie 61 ,2013, 254–258
- AMMON H.P.T.; SAFAYHI H.; MACK T.;SABIERAJ J.** Mechanism of antiinflammmtory actions of curcumine and bowellic acids; 1.of Ethnopharmacology ,1993,38:113-119.
- ANIYA Y., MIYAGI C ., NAKANDAKARY A., KAMIYA S., IMAIZUMI N., ICHIBAT.,** Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. Phytomedicine, 2002,9: 239-244.

- ASEN S., PLIMMER J.R.S.,** 4,6,4'-Trihydroxy aurone And Other Flavonoids From *Limonium*. *Phytochemistry*, 1972, 11:2601-2603.
- ASKRI H., BELMECHERI A., BENRABAH B.** Géologie de l'Algérie, contribution de SONATRACH Division Exploration, Centre de Recherche et Développement et Division Petroleum Engineering et Développement, 1994.
- ATUL UPADHYAY, EMMY TUENTER, ADNAN AMIN, VASILIKI EXARCHOU, NINA HERMANS, SANDRA APERS, LUC PIETERS.** 5-O-Demethylnobiletin, a polymethoxylated flavonoid, from *Citrus depressa* Hayata peel prevents protein glycation. *Journal of Functional Foods* . Volume 11, November 2014, Pages 243–249
- BABAAMER, Z. Y., SAKHRI, L., AL-JABER, H. I., AL-QUDAH, M. A., ABU ZARGA, M. H.** Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2012, 14 : 1137-1143.
- BABULA P., VOJTECH A., LADISLAV HAVELAND RENE KIZEK.,** Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2009, 5:47-68.
- BACHIR A.K., ABDELLA A.A., WASFI I.A., HASSEN E.S., AMIRI M.H., CRABB T.A.,** Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int J Pharmacognos*, 1994, 32(4): 366-372.
- BAS E; M.CARMEN R. ; ROSA M.G. ;SALVADOR M.;MIGUEL CERDA N.;JOSÉ LUIS RIOS** Anti-Inflammatory Activity of 5- O -Demethylnobiletin, a Polymethoxyflavone Isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Medica* ,2006 ,72:136-142.
- BASILE A., GIORDANO S., LOPEZ-SAEZ J. A., COBIANCHI R. C.,** *Phytochemistry*,1999, 52:1479-1482.
- BRUCE A. BOHM, TOD F. STUESSY .** *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)* Springer Science & Business Media, 15 mars 2001 , 831 pages
- BELBOUKHARI N. &CHERITI A.** Flavonoids from *Limoniastrum feei* *Research Journal of Phytochemistry.*, 2007, 1(2), 74-78.
- BELBOUKHARI N.** Etude chimique et évaluation biologique de deux plantes médicinales endémiques du sud ouest algérien: *Launaea arborescens* et *Limoniastrum feei* . Thèse de doctorat en chimie organique .Université Sidi Bel Abbes, 2007 ,143 p

- BELBOUKHARI N., CHERITI A.** Antibacterial investigation of the medicinal plant, *Launaea Naudiculus* . Elec. Journal of Environmental, Agronomy & Food Chemistry, 2008, 7: 27-49
- BELBOUKHARI N., CHERITI A.,** Flavonoids of *Limoniastrum feei*. Research Journal of Photochemistry, 2007, 1(2): 74-78.
- BELBOUKHARI N., CHERITI A.,** Antibacterial and antifungal activities of crude extracts from *Launaea arborescens* , Pak. J. Bio. Sci., 2006, 9: 1, 1-2.
- BELLAKHDAR, J.,** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires'. IBIS Press ,1997 .
- BERNARD F., JOSEPH S.,** Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach.CRC Press, 1996 ,288 pages
- BHATT, K.R.; MEHTA, R.K.; SHRIVASTANA, P.N.** A simple method of recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema; Indian J. of Physiology and Pharmacology ,1977 , 21: 399-400.
- BIGLARI F, AIKARKHI A.F.M., AND EASA.A.M .**Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactyl era*) fruits from Iran.Food Chemistry. 2008,107, 1636-1641.
- BINDER RG.,E. BM., FLATH RA.,** Eight 1,4-naphthoquinones from juglans.Phytochem, 1989, 28: 2791–2801.
- BOHM, BRUCE A., STUESSY, TOD F.** Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae).Springer Science & Business Media, 2001 , 831 pages.
- BONNAILLIE, C., SALACS, M., VASSILIOVA, E., SAYKOVA, I.** Etude de l'extraction de Composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 2012, n° 7, pp. 35-45.
- BONNEFONT R.D, THEROND, P., DELATTRE, J**Radicaux libres et antioxydants.In : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine- sciences. Flammarion (Ed). Paris.2003,59-81.

- BOUDERMINE S., MALAFRONT N., BGHIDJA N., BENAYECH S., ESPOSITO A., VELOTTO S., SEVERINO L.,** Phytochemical investigation and antiproliferative activity of *Limoniastrum feei* (girard) batt. Pharmacologyonline ,2014, 142 (141-144).
- BOUKHALFA D.** Biodiversity Conservation and Sustainable Natural Resource Management, united nations development programme: Global environmental facility Project of the government of Algeria,2001, 47.
- BOULENOUAR, N., MAROUF, A., CHERITI, A., BELBOUKHARI, N.** Medicinal plants extracts as source of antifungal agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, J Agr Sci Tech, 2012, 14, 659-669.
- BOUTRIFA I., AL HAJARI S., ABDELLY C., SFAR S.,** Antioxidative and Free Radical of *Limonium Axillare* from Qatari Coasts. WbmedCentral Pharmaceutical Sciences ,2010,1(9):WMC00570.
- BRUNETON, J.** Composés phénoliques, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales,3ème édition, Tec et doc, Paris,2005 , 233-447.
- BRUNO B., ALBERTO V., PILAR M., DOMENICO M., GIULIANO DELLE M.,** Prenylated Flavonoids: Pharmacology and Biotechnology Current Medicinal Chemistry, 2005, 12, 713-739
- CADET J, BELLON S, BERGER M, BOURDAT A.G, DOUKI T, DUARTE V, FRELON S, GASPARUTTO D, MULLER E, RAVANAT J.L, SAUVAIGO S.** Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrat specificity of DNA repair glycosylases. Biol.Chem.2002 , 383,933-43.
- CAI Y. Z., SUN M., XING J., LUO Q., CORKE H.,** Structure –radical scavenging activity relationships of Phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Science, 2006, 25: 2872-2888.
- CALIS I., BIRINCIOLUB S. S., KIRMIZIBEKMEZA H., PFEIFFER B., HEILMANND J.,** Secondary metabolites from *Asphodelus aestivus.*, Z. Naturforsch, 2006,61b: 1304 – 1310.
- CAO G., SOFIC E., PRIOR R. L.,** Antioxydant and prooxidant behavior of flavonoids:Structure-Activity Relationships. Free Radical Biology and Medecine, 1997, 22(5): 749-760.

- CARBONNELLE B. F., DENIS A., G. MARMONIERAND., RIVARGUES P.,** Bacteriologie medicale-techniques usuelles, 1987, 224-243.
- CARLO D, MASCOLO G .N, IZZO A.A, CAPASSO F.** Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Lif Sci.*1999. 65, 337-353.
- CHAABI M., BEGHIDJA N., BENAYACHE S., LOBSTEIN A.,** Activity-guided isolation of antioxidant principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. *Z Naturforsch*, 2008 , C63(11-12) :801-807
- CHAABI M; BEGHIDJA N; BENAYACHE S; LOBSTEIN A.** Activity-guided isolation of antioxidant principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* ,2008, 63: 801-7.
- CHAREF M.** Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*. These Doctorat En sciences chimique Université kasdi merbah ouargla ,2010 : 137pp.
- CHARLES N SERHAN, PETER A WARD AND DEREK W GILROY (2010).** Fundamentals of Inflammation. Cambridge university ,2010,press, 2-3.
- CHAUNG S.S.,LIN C.C.,LIN J.,YU K.H.,HSU Y.F.,YEN M.H.,** *Phytotherapy Research*, 2003, 17: 784-791.
- CHERITI A.** Plantes médicinales de la région de Bechar, Sud Ouest Algérien : Etude Ethnopharmacologique, Rapport CRSTRA. Algérie,2000.
- CHERITI A., BELBOUKHARI M., BELBOUKHARI N., DJERADI H.** Phytochemical and biological studies of *Launaea* Cass. Genus ( Asteracea) from Algerian Sahara”, *Current Topics in phytochemistry* , 2012, 67.
- CHERITI A., BELBOUKHARI N. AND HACINI S.,** *Iran. J. Pharm. Res.* ,2004, 3, 51.
- CLARKE, J.M.; SABRENA,M.B.;EDWARD,C.; JO RAE,W.** SurfactantproteinA protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages; *American Journal ofPhysiology* ,1996, 271: L310-L319.
- CONFORTI, F., SOSA, S., MARRELLI, M., MENICHINI, F., STATTI, G.A., UZUNOV, D., TUBARO, A., MENICHINI, F.,** Loggia, R.D. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants, *Journal ofEthnopharmacology*, ,2008,116, 144-151.

- CORRERA A.** Dynamique de l'utilisation des ressources fourragères par les dromadaires des pasteurs normades du parc national du banc d'arguin (Mauritanie). Thèse de Doctorat en écologie. Muséum national d'histoire naturelle de Paris, 2006, 243.
- COTTELLE N.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001. 1, 569-590.
- DENSIOV, E. T. ET AFANASEV I. B.** Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. USA, Taylor & Francis Group. 2005.
- D.P.A.T.** (Direction de la Planification et de l'Aménagement du Territoire de la wilaya de Béchar). Bulletin statistique annuel de la wilaya de Béchar de l'année 2009. Avril, 2010.
- DE PAIVA R. S., DE ALMEIDA FONTOURA L., FEIGUEIRO M.R., MAZZEI J.L., KAPLAN M.A.C.,** Chromatographic profile of two Plumbaginaceae species: *Plumbago scandens* L. and *Plumbago auriculata* LAM. *Química Nova*, 2002, 25(5): 717-21.
- DE PAIVA S. R., DA SILVA MARQUES S., FIGUEIREDO M. R., COELHO KAPLAN M.A.,** Plumbaginales: A pharmacological approach. *Florestas Ambiente*, 2003, 10(1): 98-105.
- DE PAIVA S. R., LUCILENE A. L., RAQUEL FIGUEIREDO M., AUXILIADORA C., KAPLAN M.,** Plumbagin Quantification In Roots Of *Plumbago Scandens* L. Obtained By Different Extraction Techniques. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 2004, 76(3) 499-504.
- DHALE D. A., MARKANDEYA S.K.,** Antimicrobial and phytochemical screening of *Plumbago Zeylanica* Linn (Plumbaginaceae) Leaf. *Journal of Experimental Sciences*, 2011, 2(3): 04-06.
- DIALLO A.,** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Université, Mali, 2005.
- DINDA B., CHEL G.,** 6-Hydroxyplumbagin, a naphthoquinone from *Plumbago indica*. *Phytochemistry*, 1992, 31 (10): 3652-3653.
- DINDA B., DAS S.K., HAJRA A.K.,** Chemical constituents of *Plumbago indica* roots. *Indian J Chem Sect B*, 1998, 37: 672-675.

- DOLORES LIEDO M., MANUEL B. CRESPO., MICHAEL F. FAY., MAREK W. CHASE..** Molecular Phylogenetics of Limonium and Related Genera( Plumbaginaceae): Biogeographical and Systematic Implications.American Journal of Botany. 2005 ,92 : 1189-1198.
- DUTTA S.,VANKATESH D., SOUZA R., SHENOY B .D.,UDUPI R .H., UDUPA N.,** Niosomal Delivery of Plumbagin ester for better antifertility activity. Indian Drugs, 2002,39(3) :163-165.
- EDEAS M.,** Les polyphénols de Thé. Phytothérapie, 2007, 5 : 264-270.
- EDEAS M.,** La 3ème conférence ingrédients solaires et vieillissement cutané, in société française des antioxydants.2005. Vol.9, Paris.
- ELENA O. L.** Strategies d'émission de composés organiques volatils (cov) par quatre espèces végétales méditerranéennes effet de plusieurs facteurs écologiques sur l'émission et le stockage de terpènes, thèse de Docteur en biosciences de l'environnement, université de Provence, 2006, 226.
- EL-HACI IMAD A.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémiques du sud de l'Algérie : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis artoides* Moq. & Coss. et *Limonium feei* (Gitrard) Batt. These Doctorat En Biologie Université de Abou-Bekr-Belkaid Tlemcen,2014 : 164pp.
- EL-HACI IMAD A.** Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de: *Ecballium elaterium* (L.), *Capparis spinosa* (L.) et *Limonium feei* (L.). Memoire de Magister en biologie .Université de Abou-Bekr-Belkaid Tlemcen,2009 ,110pp
- ERNEST S., PAUL M. CATLING ;** Les cultures médicinales canadiennes . NRC Research Press, Canada, 2000, 281.
- FATEN M., SOUMAYA B.,KARL GIRAUD L.,MEJDI S., KHAOULA M., ISABELLE C.,CHEDLY A., JEAN L., RIADH K.,**Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages South African Journal of Botany 2015, 99 : 158–164
- FAVIER A.,** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potential thérapeutique, l'actualité chimique. 2003.108 -114.



- FIRUZI O., LACANNA A., PETRUCCI R., MARROSU G., SASO L.,** Evaluation of the antioxydant activity of flavonoids by Ferric Reducing Power Assay and Cyclic Voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1721:174-184.
- FORMICA J.V., REGELSON W.,** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33: 1061-80.
- GHEDIRA K.,** Les flavonoïdes : structure, propriétés, biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, 4 : 162-169.
- GONÇALVES J. L. S., LEITÃO S. G., DELLE MONACHE F.,** In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 2001,8 (6): 477-80.
- GORDON M.H.** The mechanic of antioxydant action in vitro. *Food antioxidants*. Hudson B.J.F. (ed.), Elsevier, Amsterdam.1990.1-18.
- GUAN YE.,CHENGGANG H.,** Flavonoids of *Limonium aureum*.*Chemistry of Natural Compounds*, 2006, 42(2).
- GUAN-HUA D., AI-LIN L., HAI-DI W., SIMON MINGYUEN L., YI-TAO W.,** Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities .*Bioorganic & Medicinal Chemistry* ,2008, 16,7141–7147.
- GURIB-FAKIM A.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicinem* ,2006, 27 : 1-93.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Method in Enzymology*.1990.186,1-85.
- HAMMAMI S., NGUIR A., SAIDANA D., CHERIAA J., MGURI Z.,** Chemical analysis and antimicrobial effects of essentil oil from *Limoniastrum guyonianum* growing in Tunisia.*Journal of Medicinal Plants Research*, 2011,5(12): 2540-2545.
- HARBORNE J.B.** *The Flavonoids Advances in Research Since*. CRC Press, 1986, 1993 - 676 p
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.** Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 2000, 55, 481-504.

- HEIM K. E., TAGLIAFERRO A. R., BOBILYA D. J.**, Flavonoids antioxydants :chemistry, metabolism and structure- activity relationships. The journal of nutrition biochemistry, 2002,13(10): 572-584.
- HORIE, TOKUNARU; KOURAI, HIROKI; FUJITA, NOBUHISA** Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1983 , vol. 56, 12 p. 3773 – 3780.
- HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J.-L.** Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In: Tringali, C. Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties. Londres: Taylor and Francis e-Library, 2004, pp. 31-68.
- HUANG D.O.B, PRIOR R.L.** The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry.2005,53, 1841-1856.
- HYE-YEON P.; MIHYANG K.; JAEHONG H.**, Stereospecific microbial production of isoflavanones from isoflavones and isoflavone glucosides. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91,(4), 1173-1181
- ISERIN P.** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, (2001) ; 335.
- IMRE, S., OZTUNG, A., WAGNER, H.**, Phytochemistry, 1977. 16, 799.
- IVANOVSKA,N.; PHILIPOV, S.; ISTATKOVA, R.** Evaluationo anti-inflammatory activity of plants used in Bulgarian folk medicine; FITOTERAPIA ,1997, LXVIII (5), 417-422.
- JAVANOVIC S.V, STEENKEN S., TOSIC M., MARJANOVIC B., SIMIC M.J.** Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society. 1994.116, 4846-4851.
- JEAN-MICHEL MERILLON, CHEDLY ABDELLY , RIADH KSOURI .** Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum* Food Chemistry,(2012) , 135: 1419–1424
- JEYACHANDRAN R., MAHESH A., CINDRELLA L., SUDHAKAR S., PAZHANICHAMY K.**, Antibacterial Activity Of Plumbagin And Root Extracts Of *Plumbago Zeylanica* L.Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, (2009).51(1): 17–22.

- JIANGSU.**, New Medicine College, Chinese Meteria Medica Dictionary, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, 1977, 1567;
- JIANGSU.**, New Medical College, Zhongyao Dictionary (Encyclopedia of Chines Materia Medica), Scientific and Technological Press, Shanghai , 1979, p711-712.
- JONES, W.P. AND KINGHORN, A.D.** Extraction of plant secondary metabolites. In Natural Products Isolation, Humana Press, 2 ème éd., Totowa, 2006, 323-351.
- JUNG IM L., CHANG-SUK K., MYOUNG EUN J., JOO WAN H., SUN YOUNG L., YOUNGWAN S.,** Antioxidant Activity of the Hlaphyte *Limonium tetragonum* and its Major Active Components. *Biothecnology and Bioprocess Engineering* ,2011, 16: 992-999.
- KANDIL F. E., AHMED K. M., HUSSIENY H. A., SOULIMAN A. M.,** A new flavonoid from *Limonium axillare*.*Archiv der Pharmazie: Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 2000, 333: 275-277
- KANDIL F. E., AHMED K. M., HUSSIENY H. A., SOULIMAN A. M.,** A new flavonoid from *Limonium axillare*.*Archiv der Pharmazie: Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 2000, 333: 275-277
- KAYOKO M. & NOBUJI N .** Antioxidative Activity of Flavonoids from Thyme (*Thymus vulgaris* L.) *Agric. Biol. Chem.*,2014, 53 (11), 3043,,-, 3045, 1989 .
- KHLEBNIKOV A. I., SCHEPETKIN I. A., DOMINA N. G., KIRPOTINA L. N., QUINN M. T.,** Improved quantitative structure-activity relationship model to perdict antioxydant activity of flavonoids in chemical enzymatic, and cellular system. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*,2007,15:1749-1770.
- KINSELLA J.E, FRANKEL E, GRMAN B, KANNER,J .** Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*.1993.47, 85-89.
- KOLECHLIN R.C.**Oxygène, stress oxydant et supplementations anti-oxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et métabolisme*. 2006. 20,165-177.
- KORUL KINA L .M., SHUL'TS E .E., ZHUSUPOVA G .E., ABILOV ZH .A., ERZHANO K .B.,CHAUDRI M .I.,** Biologically Actives Compounds From *Limonium Gmelinii* And *.Popovii*.*Chemistry of Natural Compounds* 2004,40(5).

- KOZHAMKULOVA Z .A., RADWAN M .M., ZHUSUPOVA G .E., ABILOV Z.ZH.,RAHADILOVA S.N., ROSS S.A.,** Gmelinoside I, a new flavonol glycoside from *Limonium gmelinii*. Nat Prod Commun, 2010,5(7): 1061-1062.
- KUBITZKI K., Rohwer J.G ., Bittrich V.** The Families Plumbaginaceae and Genera of Vascular Plants, vol II. Springer-Verlag, Berlin,1993, 523-530
- KUMAR R., KUMAR S., PATRA A., JAYALSHMI S.,** Hepatoprotective activity of aerial parts of *Plumbago Zeylanica Linn* against Carbon TetraChloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 1: suppl 2009, 1, 171-175.
- KUO Y. C., LIN L. C., TSAI W. J., CHOU C. J., KUNG S. H., HO Y. H.,** Samarangenin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002,46: 2854–2864.
- LAURENCE L.S.** Les radicaux libres.2002
- LEBLANC GA .,** Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 2010, 125-236.
- LEFAHAL M.,** Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles Plumbaginaceae, Tamaricaceae et Apiaceae. Thèse doctorat en sciences en chimie organique 2014 .127pp
- LI C.; ADAM S.; ERAN P.; FENG S.; A.DANIEL.,** Identification of methylated flavonoid regioisomeric metabolites using enzymatic semisynthesis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Metabolomics 2012 ; 9(S1):92-101
- LI H.L., (1978).** Plumbaginaceae, Flora of Taiwan, Epoch Publishing Co. Ltd.,Taipei.
- LIAN-RU ZHANG., GUO-LIN ZOU.,** Flavonol of *Limonium bicolor*. Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40(6).
- LIAN-RU Z., GUO-LIN Z.,** Flavonol of *Limonium bicolor*. Chemistry of Natural Compounds, 2004,40(6).
- LIE-CHWEN L., LING-LING Y., CHEN-JEN C.,** Cytotoxic naphthoquinones and Plumbagin acid glucosides from *Plumbago Zeylanica*. Phytochemistry, 2003,62(4): 619-22

- LIE-CHWEN LIN., CHENG-JEN CHOU.,** Flavonoids and Phenolics from *Limonium sinense*. *Planta Med*, 2000, 66(4): 382-383.
- LIEBLER D.C., KLING D.S. REED D.J.** Antioxidant protection of phospholipids bilayers by a tocopherol. *J. Biol. Chem.* 1986, 51, 1214-1219.
- LII S, GRAIG E.A.** The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 1988, 63, 1-677.
- LOPEZ-LAZARO M.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Z. Naturforsch C.* 2000, 735 (11-12): 898-902.
- MARIN, F.R., FRUTOS, M.J., PEREZ-ALVAREZ, J.A., MARTINEZ-SANCHEZ, F., DEL RIO, J.A.** Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation, *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, 2002, 26, 741-778.
- MARKHAM K. R., TERNAY B., STANLEY R., GEIGER H. AND MABRY T. J.** *Tetrahedron.* 1978, 34, 1389-1397.
- MARKHAM, K.R.** Flavones, flavonols and their glycosides. In *Methods in plant* 1989.
- MARKHAM, K.R.** <sup>13</sup>C NMR of flavonoids-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, 1976, 32, 2607-2612.
- MARKHAM, K.R. AND GEIGER, H.** *The Flavonoids Advances in research since 1986.* Edited by J. B. HARBORNE, Chapman & Hall. London, 1993.
- MARKHAM, K.R. AND MABRY, T.J.** In *the flavonoids*, (Harborne, J.B., Mabry, T. J and Mabry, H. editions Chapman and Hall, London, p. 45, 1975.
- MCCORD J.M.** Superoxide radical: controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1995. 202, 112-117.
- MENDELSON R; MJ. BALICK.** The value of undiscovered Pharmaceuticals in tropical forest. *Economic Botany.* 1995, 49: 223-228.
- MEOT-DUROS, L., CERANTOLA, S., TALARMIN, H., LE MEUR, C., LE FLOCH, G. AND MAGNÉ, C.** New antibacterial and cytotoxic activities of falcarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(2), 553-557.

- MILANE H.(2004).**La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et application thérapeutique. thèse de doctorat.2004.20-22
- MOAMMIR H .A., NANCY E., DRECKSHMIDT., AJIT K.,** Plumbagin a medicinal plant derived naphthaquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone refractory prostate cancer.Cancer Res, 2008,68(21):9024-32.
- MOHAMMEDI. Z,** Etude de pouvoire antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelque plantes de la région de Tlemcen , thèse de magistère 2005-2006.p28 .
- MOKHTARI A., BRAHIMI K., BENZIADA R.** Architecture et confort thermique dans les zones arides Application au cas de la ville de Béchar. Revue des Energies Renouvelables, 2008 ; 307 – 315.
- MONTORO, P., TUBEROSO, C.I.G., PIACENTE, S., PERRONE, A., DE FEO, V., CABRAS, P., PIZZA, C.** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J Pharm Biomed*, 2006, 41, 1614-1620.
- MOORE SB., HOPKE NJ.,** Discovery of New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *Chem Biochem*, 2001,2: 35–38.
- MORTADA M. EL-SAYED , HANAN A. EL-NAHAS , EL-SAYED S. ADEL-HAMEED , EMAN A. EL-WAKIL(2013).** Investigation and antioxidant of phenolic compounds of the leaves of *Gleditsia Triacanthos* L. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, Vol 5, Suppl 2, 172-177
- MOVSUMOV I. S.,** Flavonoids of theroots of *Limonium caspium*.*Chemistry of Natural Compounds*, 1996, 32(6).
- MSANDA F, EL ABOUDI A, PELTIER JP.** Originalité de la flore et de la végétation de l'Anti-Atlas sud-occidental (Maroc) *Feddes Repert* ,2002 : 113. 603–15.
- MURRAY A. P.,RODRIGUEZ S., A FRONTERA M., A TOMAS M., MULET M. C.,** Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze.Z *Naturforsch*,2004,59c: 477-480.
- MYARA. J,** vieillissement et stress oxydant, radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène, cours de biochimie, 2002, pp 1-22.

- NAJLA T., SAMIA O., CAROLINE H.,V.,, PIERRE W.T.,FATEN M., JEAN-MICHEL M., CHEDLY A., RIADH K.,** Phenolic contents and biological activities of *Limoniastrumguyonianum* fractions obtained by Centrifugal PartitionChromatography Industrial Crops and Products ,2013, 49,740– 746
- NATHAN C.** Points of control in inflammation. *Nature*,2002. 420, 846-852.
- NOGUCHI, N. AND NIKI, E.** Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is behind measured by which method.*IUBMB Life*, **2000**, 50, 323-329.
- NOURSHARGH SUSSAN, FRITZ KROMBACH, AND ELISABETTA DEJANA.** The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006, 80, 714-718.
- OSSIPOV, M.H.; KOVELOWSKI, C.J.; PORRECA, F.** The increase in morphine antinoceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrindole, a selective delta-opioid antagonist; *Neuroscience Letter*.1995, 184: 173-176.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N.A., ADENAN, I.** Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans, *Food Chem*, 2007, 100, 1523-1530.
- OZENDA P.** Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris, 2004, pp 661.
- OZENDA, P.;**Flore du Sahara. Edition ,CNRS : Paris, 1982,pp 431
- PAN, M. H., LAI, Y. S., LAI, C. S., WANG, Y. J., LI, S., LO, C. Y., DUSHENKOV, S. AND HO, C. T.** 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone induces apoptosis through reactive oxygen species production, growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 expression, and caspase activation in human leukemia cells. *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55: 5081-5091.
- PELT J.M.;** Les nouveaux actifs naturels. Marabout , 2001, 219-124.
- PENDURKAR., SUDHA R., MENGI., SUSHMA A.,** Antihyperlipidemic effect of aqueous extract of *plumbago zeylanica* roots in diet induced hyperlipidemic rat.*Pharmaceutical Biology*,2009, 47(10): 1004-1010.
- PERTERSON,J.;DWYER,J.,** Flavonoids :dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr*.1998. 18, 1995-2018.

- PIETTA P. G.**, Flavonoids as antioxydant. *Journal of Natural Product*, 2000, 63:1035-1042.
- PINCEMAIL, J., BONJEAN, K., CAYEUX, K., DEFRAIGNE, J.O.** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2002,16 ,233-239.
- POPOVICI C., SAYKOVA I., TYLKOWSKI B.**, Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 2009,4 :25-39.
- QINGGANG M., CHUN W.,, ZHIGANG Z.,, WEICHENG Y., GUOLIN Z.,.** Synthesis of icariin from kaempferol through regioselective methylation and para-Claisen–Cope rearrangement. *Beilstein J. Org. Chem.* 2015, 11, 1220–1225.
- RICE-EVANS C.**, Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, 2001,8: 797-807.
- RICE-EVANS C., BURDON R.**, Free radical interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid resaerch*, 1993, 32(1) : 71-110.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G.** Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Bio Chem*, 1996, 20, 933-956.
- ROHLOFF J.** Cultivation of Herbs and Medicinal Plants in Norway –Essential Oil Production and Quality Control. Thesis Submitted for the degree of Dr. philos. The Plant Biocentre, Department of Biology, aculty of Natural Sciences and Technology Norwegian University of Science and Technology, NTNU Trondheim, Norway,2003.
- ROSS S.A.**, Myricetin-3'-Methyl Ether-7-Glucoside from *Limonium Sinuatum*.*Journal of Natural Products*, 1984, 47(5): 862-364.
- SAIDANA D., MAHJOUR S., BOUSSAADA O., CHRIA AJ., ALI MAHJOUR ., CHÉRAIF I.,DAAMI M., MIGHRI Z., HELAL A. N.**, Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oils of Two Saltcedar Species from Tunisia.*J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85:817–826.
- SANCHEZ-MORENA, C.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science Technology International*,2002, 8, 121-137.



- SCHMIDT A, LI C, SHI F, JONES AD, PICHESKY E.** Myricétine polyméthylés dans les trichomes des espèces de tomates sauvages de *Solanum habrochaites* et la caractérisation de trichome spécifique 3' / 5' et 7' / 4'-O-méthyltransférases myricétine. . *Usine Physiol* , 2011 ,155 (4): 1999-2009.
- SEGUENI N., AMAR Z., FAIROUZ M ., MESBAH L ., SALAH R.** Flavonoids from Algerian propolis, *Arabian Journal of Chemistry* 2013
- SEKKOUM, K., BELBOUKHARI, N., CHERITI, A.** New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launea arborescens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ,2014, 4 : 267-271.
- SEN, T.; NAG C. A.K.** Antiinflammatory evaluation of *Pluchea indica* root extract 1. of *Ethnopharmacology* ,1991, 33: 135-141.
- SERKEDJIEVA J., IVANCHEVA S.,** (1998). Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J Ethnopharmacol*, 64 (1): 59-68.
- SHEEJ, E., JOSHI, S.B. AND JAIN, D.G.** Biossay guided isolation of antinflammatory and antinociceptive compound from *Plumbago zeylanica* leaf , *pharmaceutical Biology* ,2010,48,381-387.
- SHAN, B., CAI, Y.Z., BROOKS, J.D., CORKE, H.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts, *Int J Food Microbiol*, 2007, 117, 112-119.
- SHAHID, F.** Natural antioxidant chemistry health effects, and applications. AOCS Press: Urbana.1997.
- SHEEJA E., SIDDHESWAR B., JOSHI, DHARMA C.,** Antifertility activity of leaves of *Plumbago Zeylanica* Linn in femal albino rat. *The European Journal of contraception and reproduction health care*, 2009,14(13):273-277.
- SHIMING LI , PAN, M. H., LAI, C. S., LO, C. Y., DUSHENKOV, S. AND HO, C. T.** Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymath- oxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 2007,15: 3381-3389.
- SHIMING LI, CHIH-YU LO, CHI TANG** Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel , *J. Agric. Food. Chem.* 2006, 54, 4176-4185

- SISS MH, LE BON AM, LAVIER C.** Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* 2000, 12 (1-4): 193-9.
- SILVA, E. M., SOUZA, J,N,S,ROGEZ, H., REES, J,F, AND LARONDELLE, Y.** Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*,2007, 101, 1012-1018.
- SINGH, S.; BANI, S.; SINGH, S. B.; GUPTA, B. D.; BANERJEE,S. K. ; SINGH, B.** Anti-inflammatory activity of lupeol; *FITOTERAPIA*; ,1997,LXVIII (1): 9-16.
- SINGLA, A. K.; PATHAK, K.** Topical antiinflammatory effects of *Euphorbia prostrata* on carrageenan-induced footpad oedema in mice ; *Journal. Of Ethnopharmacology*,1990,29: 291-294.
- STOCKER O.** Water- and Photosynthesis-Relations of Desert Plants in the South Algerian Sahara: III. Annual Course and Constitutional Types,1974, 163(6), 480–529.
- SUZUKI, T.; KISHIMOTO, Y.; MISAWA, M.** Formalin-and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine; *Life Science* ,1996, 59: 1667-1674.
- TAKAHASHI T., KOKUBO R., SAKAINO M.,** Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus aculata*. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39 (1): 60-4.
- TING-TING J., JUNG-HUI C., BING-CHUNG L., CHIEH-MING J. C.,** Extraction and purification of flavanone glycosides and kaemferol glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds by salting-out using hydrophilic isopropanol. *Separation and Purification Technology* ,2009, 67 : 31–37
- TSUKASA I., HIROAKI S., JUNICHI K.,** Flavonoids from the Leaves of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae), and their Qualitative and Quantitative Comparison between Coastal and Inland Populations . *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 2011,37(2), pp. 87–94, May 22,
- TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., MOORE D. M., VALENTINE D.H., WALTER S.M., WEBB D.A.,** *Flora Europaea III* , Cambridge University Press, Cambridge,1972, 3,29.

- VAN ACKER S. A. B. E., VAN DEN BERG D. J., TROMP M. N. J. L., GRIFFIOEN D. H., VAN BENNEKOM W. P., VAN DER VIJGH W. J. F., BAST A.,** Structural aspects of antioxydant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(3): 331-342.
- VIANA, C. F. G.; ARAGAO, A. G. M.; RIBEIRO, RA.; MAGALHAES, J. F. G.; YALE, M . R.** Effects of *Ageratum connyzoides* in nociception and inflammation response induced by zymosan; *Fltoterapla*,1998,LXIX (4): 349-354.
- WALL.** JAntioxidant in prevention of reperfusion damage of dasclar Endothelium, Review, Volume 1, *Pharmacology*. 2000. 103-125.
- WEI F., MA SC, MA LY.,** Antiviral flavonoids from the seeds of *Aesculus chinensis*. *J Nat Prod*, 2004, 67 (4): 650-3.
- WINTER CA, RISLEY EA, NUSS GW.** Carrageenan-induced oedema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*; 1962,111:544-7.
- WOODMAN O. L., MEEKER W. F., BOUJAOUNE M.,** Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones : Structure-Activity Relationships. *Journal of cardiovascular Pharmacology*, 2005, 46: 302-3093.
- XIN J., ZHENHAI Z., SUN E., SONGLIN L., XIAOBIN J .,** Statistically designed enzymatic hydrolysis of an icariin/b-cyclodextrin inclusion complex optimized for production of icaritin. *Acta Pharmaceutica Sinica B* ,2012,2(1),83-89.
- YADAVA R. N., TIWARI L.,** A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma* O. Kuntze. *J Asian Nat Prod Res*, 2005,7 (2): 185-8.
- YEŞILYURT, V., HALFON, B. ÖZTÜRK, M., TOPÇU,G..**Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*, *Food Chem*, 2008, 108, 31-39.
- YOSHIHISA A ,WEI L, TAKAFUMI Y.** Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry* ,2000, 55: 447-456.
- YOUNG HAE C., FEDERICA M.,CORNELIS E., FRANK VAN DER K., ROBERT V.,** Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food Chemistry* ,2009, 116, 575-579.

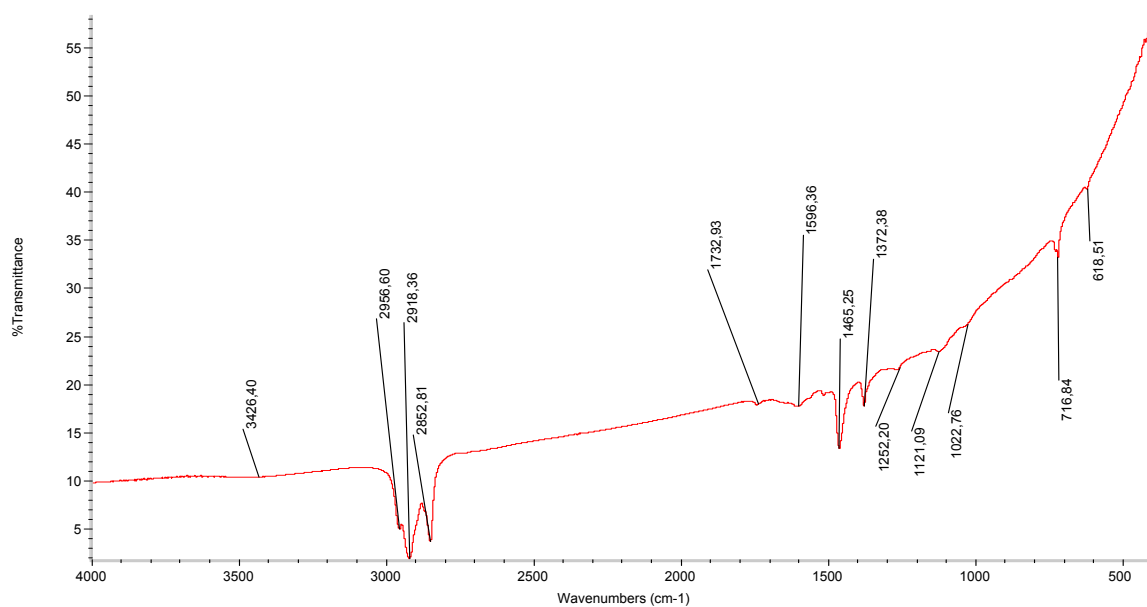
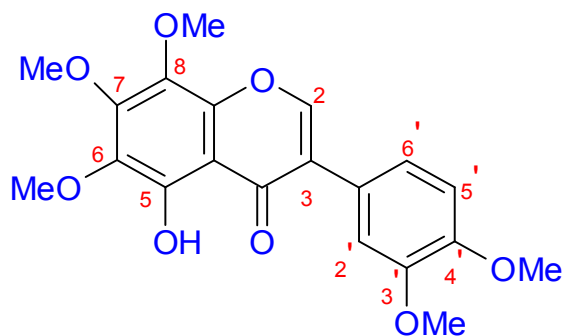
- YU, Z. ET R. A., DAHLGREN** Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, 26(9): 2119-2140.
- YUH-CHI K.,LIE-CHWEN L.,WEI-JERN T.,CHENG-JEN CH.,SZU-HAO K., YEN-HUI H.**, Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes SimplexVirus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(9): 2854–2864.
- ZAKARIA M. B., JEFFREYS J. A. D., WATERMAN P. G., ZHONG S.M.**, Naphtoquinones and triterpenes from some asian *Diospyros* species. *Phytochem*, 1984, 23: 1481–1484.
- ZHANG Y, WANG QS, CUI YL, MENG FC, LIN KM .**, Changes in the intestinal absorption mechanism of icariin in the nanocavities of cyclodextrins. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7: 4239–4249
- ZHONG S. M., WATERMAN P. G., JEFFREYS J. A. D.**, Naphtoquinones and triterpenes from african *Diospyros* species. *Phytochem*, 1984, 23: 1067–1072
- ZHUSPOVA G. E., ABIL'KAEVA S. A.**, Flavanes FROM *Limonium gmelinii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2006, 42(6).

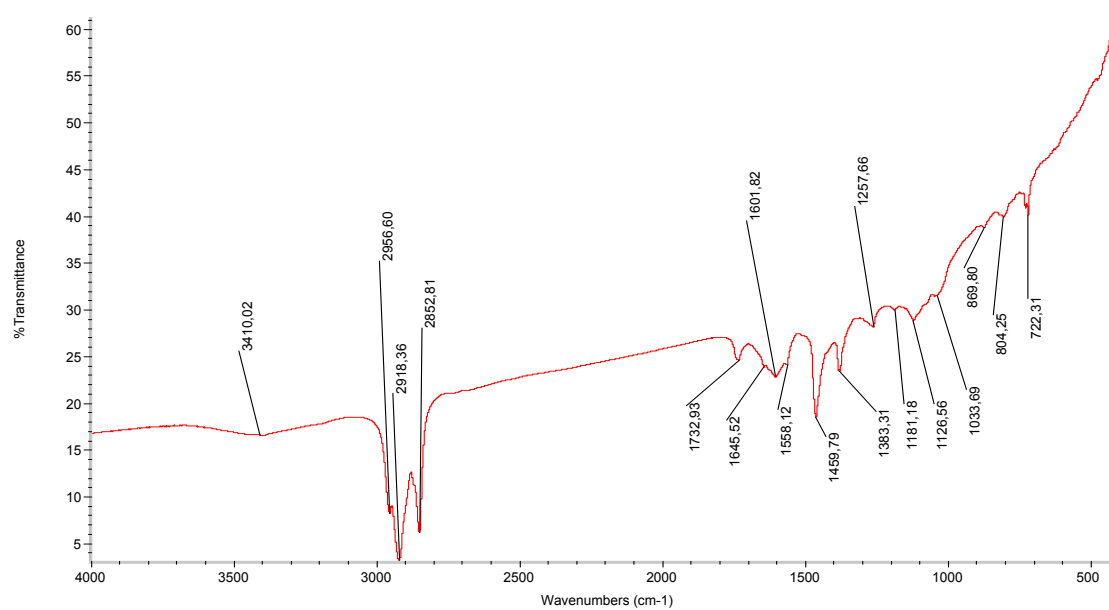
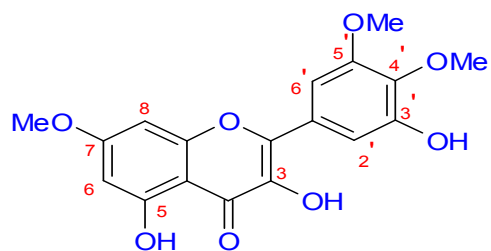


# *Annexes*

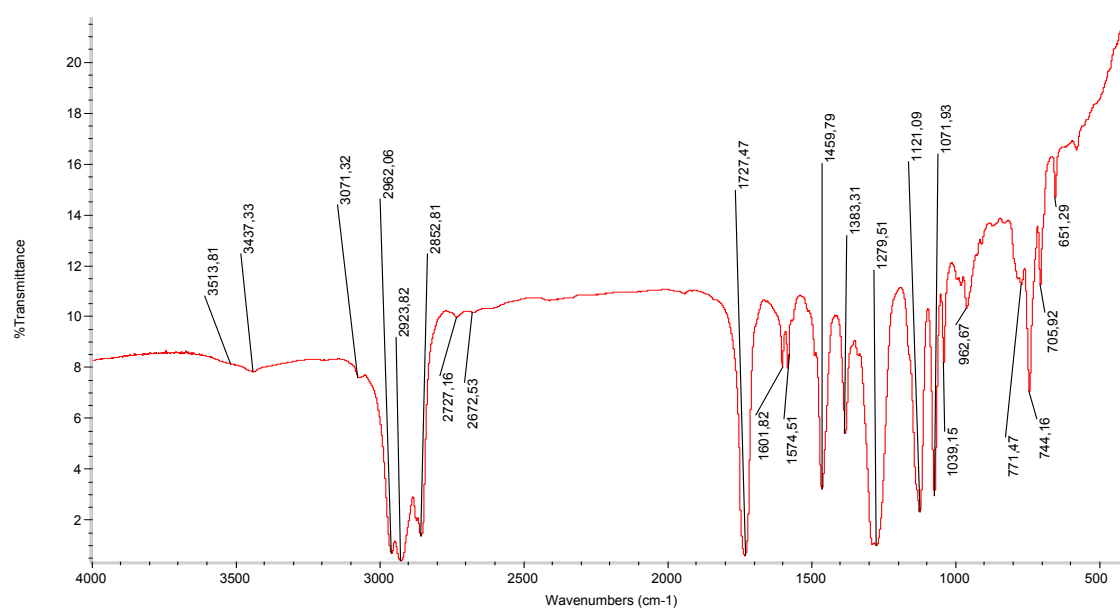
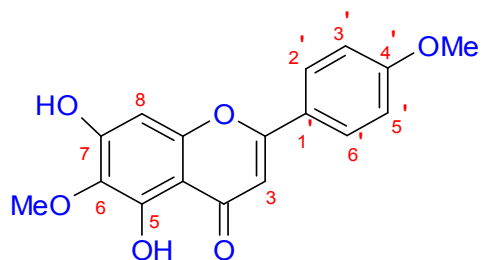


**Annexe 1** Spectre IR et Structures proposées du composé **LF1**, le 6, 7, 8, 3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone



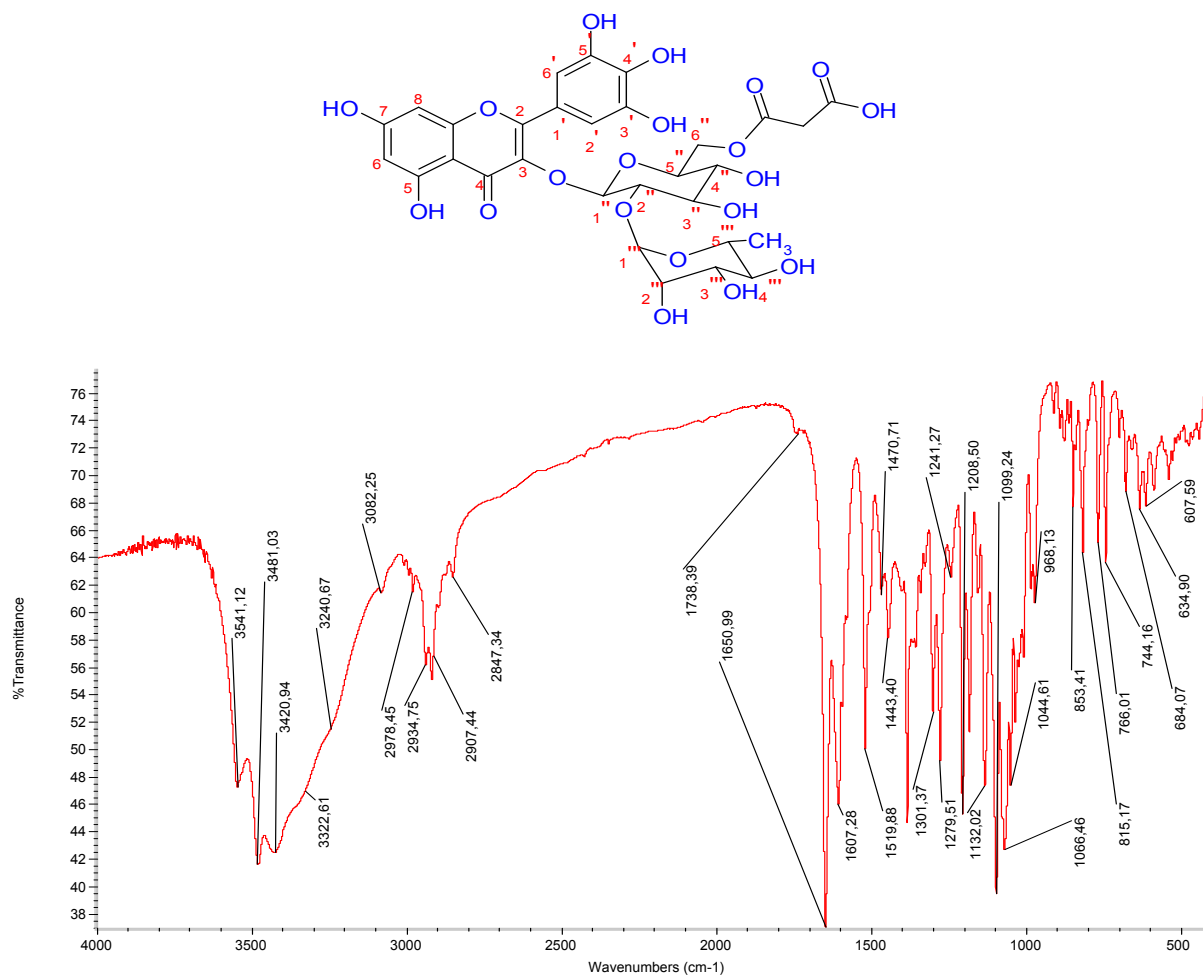
**Annexe 2** Spectre IR et Structures proposées du composé LF2, le 3',5 hydroxy 7,4',5'-trimethoxy flavonol

### Annexe 3 Spectre IR et Structures proposées du composé LF3, la 5,7-dihydroxy 6,5'-dimethoxy flavone

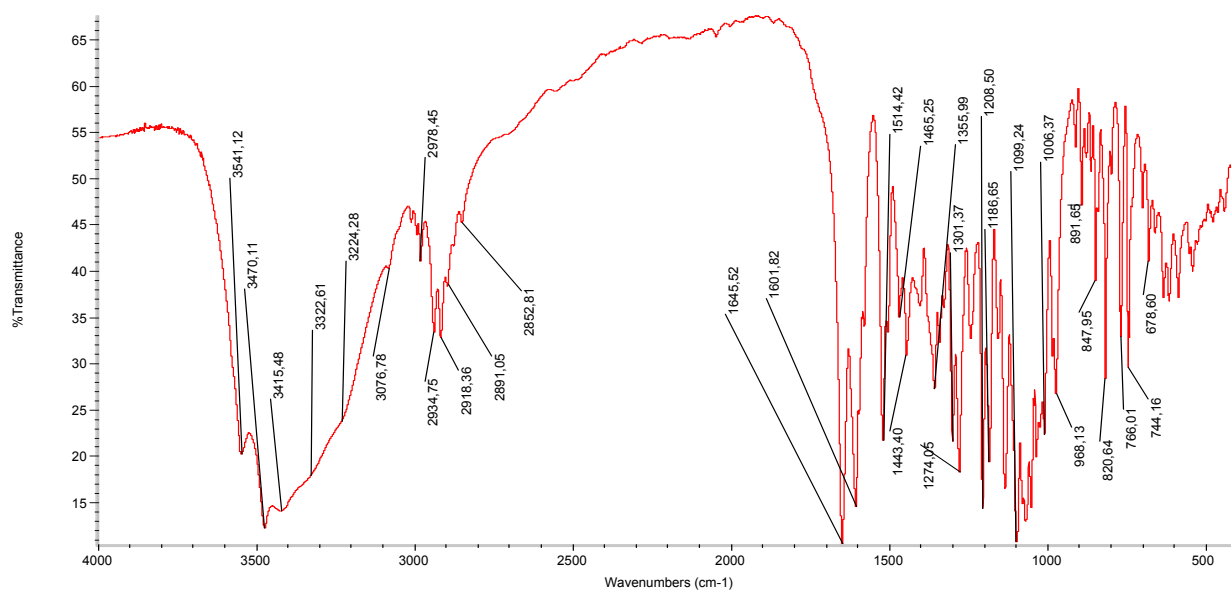
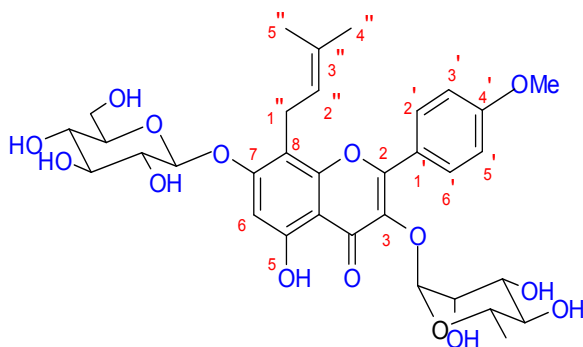




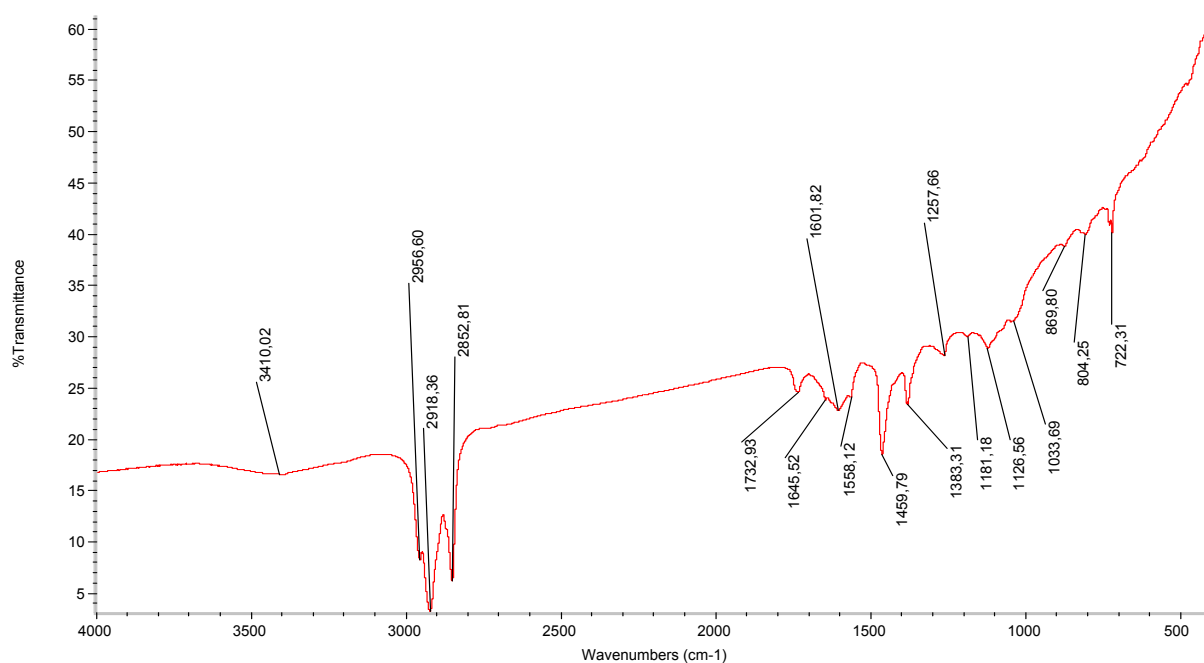
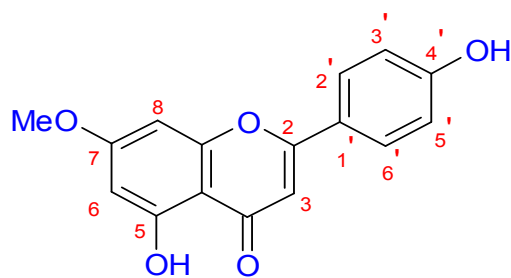
**Annexe 4** Spectre IR et Structures proposées du composé **LF4**, la 3-O-(glucoside-6''-malonyl,2''-ramnosyl) 5, 7, 3',4',5'-Pentahydroxy flavonol



**Annexe 5** Spectre IR et Structures proposées du composé **LF5**, la 4'-O-méthyl-8-prénylkaempferol-3-rhamnoside-7-glucoside (Icariin)



**Annexe 6** Spectre IR et Structures proposées du composé **LF6**, la 5,4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone ou (Genkwanine)



## Annexe 7

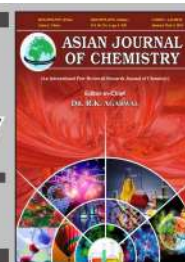
**Pléthysmomètre LE 7500** numérique est un instrument utilisé pour déterminer les variations de le volume des branches de rongeurs. Il mesure la variation de niveau de liquide lorsque le membre est inséré dans un réservoir. L'introduction d'un tissu (ou tout autre objet) dans le récipient modifie le niveau de fluide et la conductivité entre deux électrodes de platine introduits précédemment dans le récipient. Ce changement est exprimée en millilitres avec une résolution de 0,01 ml.



**Figure 4** mesures du volume de la patte dans le Pléthysmomètre



**Figure 5** gonflement de la patte de souris



## Phytochemical Investigation of Bioactive Extract from Endemic Medicinal Plant *Limoniastrum feei* (Girard) Batt (Plumbaginaceae)

SMAHIA RAHMANI<sup>1</sup>, NASSER BELBOUKHARI<sup>1,\*</sup> and ABDELKRIM CHERITI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bioactive Molecules and Chiral separation Laboratory, University of Bechar, Béchar 08000, Algeria

<sup>2</sup>Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, University of Bechar, Béchar 08000, Algeria

\*Corresponding author: E-mail: [belboukhari.nasser@yahoo.com](mailto:belboukhari.nasser@yahoo.com)

Received: 27 February 2013;

Accepted: 9 December 2013;

Published online: 15 January 2014;

AJC-14544

The phytochemical investigation of bioactive extract of aerial part of *Limoniastrum feei* led to isolation of eleven polyphenol compounds, with two major constituents obtained from the bioactive extract of stems part, identified as glucosylated flavonoids: 3-O-(glucoside-6"-malonyl, 2"-ramnosyl)-7,4',5'-trimethoxy-3-hydroxy flavonol and tetraacetate 7,8-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone 8-O-β-glucopyranoside. The compounds were isolated for the first time from the plant extracts by column chromatography and prep-HPLC and structural elucidation was carried out on the basis of their spectral analysis.

**Keywords:** *Limoniastrum feei*, Plumbaginaceae, Flavones, Isoflavone, LC-UV, TLC.

### INTRODUCTION

*Limoniastrum feei* (plumbaginaceae) is a herbaceous medicinal plant endemic to Algeria and Morocco Sahara. The aerial parts of this plant were used in Sahara folk medicine for treating gastrointestinal tract ailments, fever, icterus and various diseases. The plant is native to the southeast of Algeria (Saoura, region of Bechar), Northern Africa<sup>1-3</sup>.

According to our previous results, biological activity of several extracts of aerial parts (leaf, stem and twig) of *L. feei* against fungi and bacteria was evaluated by disc diffusion method. Now we are interested in isolating the natural compounds responsible of this biological activities<sup>4-6</sup>.

### EXPERIMENTAL

The IR spectra ( $\nu_{\max}$ ) were determined on a AVATAR 320 FT-IR spectrophotometer. 1D and 2D NMR spectra were obtained on a Bruker Avance DRX 300 FT spectrometer operating at 300 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 75 MHz for <sup>13</sup>C NMR. The LC system consisted of a liquid chromatography (Si-gel-230-400 mesh, MerK- were used for column chromatography) operating at room temperature with a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> and the UNICAM UV 300 spectrophotometer detector operating at wavelength of 210 nm.

**Plant material:** The whole plants of *Limoniastrum feei* were collected from Kenadza (region of Bechar) Algeria. The botanical identification and voucher specimen were deposited in the herbarium of the Phytochemical & Organic Synthesis

Laboratory. The assigned specimen number was (CA99/14)<sup>3,6</sup>. The leaves, stems and twigs were separated, dried and ground into powder using a grinder.

**Extraction and fractionation:** Dried and ground stems, twigs and leaves of *Limoniastrum feei* (350 g) were extracted with acetone-water (400 mL, 75 %). The extract was concentrated in water and partitioned with hexan, diethyle ether, ethyle acetate and *n*-butanol (50 mL in 3 steps)<sup>7</sup>. To purify and identify the constituents of three fractions; ethyle ether, ethyle acetate and butanol, separation by liquid chromatography coupled with UV detector (LC-UV) was developed in our laboratory<sup>8,9</sup>.

### RESULTS AND DISCUSSION

The protocol used for isolation of these natural substances of the plant is made in two stages: In the first one makes a solid-liquid extraction with a solvent appropriate to the ground plant organ. The second step is a liquid-liquid fractionation of the crude extract of plant organs in three solvents of different polarity<sup>10</sup>.

The yield mass fractions are related to the polarity of the solvent, it is noted that the butanol extract is the most important (0.81-1.51 %). The TLC analysis, was performed; on TLC plate of silica gel eluting by two systems of different polarity with: acetone/toluene/formic acid (6/8/1)<sup>4,11</sup>. The results of this study and analytical extraction are summarized Table-1. Table-1 shows the presence of several compounds in the ether fraction and ethyl acetate, by visualizing a spot against in the butanol

fraction at  $R_f = 0.85$ , with absorbance at 254 nm color purple but this spot we had not seen, when eluting with E1.

TLC analysis of stem extract shows 4 components in all three fractions, 3 components in both ether fraction and ethyl acetate and were sometimes separated a compound in the butanol extract has an  $R_f = 0.57$ . We reverse the order of fractionation starts with the most polar solvent (Table-1).

TLC analysis also shows the presence of 4 components in all three fractions, two in butanol extract (first extract). It has happened has separated the same compound ( $R_f = 0.57$ ) in the ether fraction and another is in the extract of ethyl acetate  $R_f = 0.17$ .

The analytical results indicate the presence of 5 total compounds (5 spots), including the compound at  $R_f = 0.50$  appears in all three fractions. It is noted that the two fractions ether and ethyl acetate, contain almost the same constituents. Compared against a sample of stem, we note the presence of the compound at  $R_f = 0.66$  in both fraction (ether and ethyl acetate) of the two parts of the plant.

The phytochemical screening of three parts of *Limoniastrum feei* on tannins and glycosylated flavonoid, show presence of flavonoid in ethyl acetate and butanol fraction in considerable quantities and total absence in ethyl ether, but the tannin derivative are present in all parts.

It is also observed that the extracts of ethyl acetate and butanol are the richest in anthocyanins by contribution to other extracts *e.g.*, aqueous and ether extracts.

Analytical results obtained previously, we opted for the purification of two fractions butanol and ethyl acetate extract of acetone-water (*L. feei*).

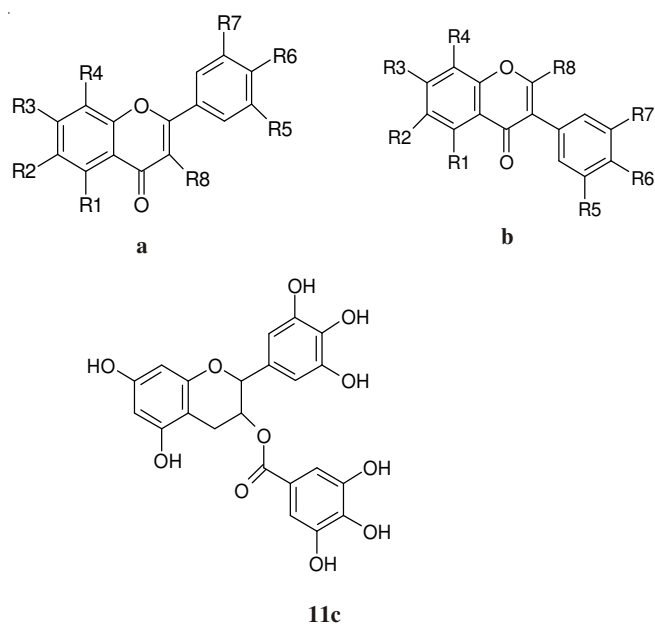
The spectroscopic analysis was performed on 11 compounds isolated from the acetone-water extract distributed in the three organs as follows: 6 from twigs, 4 from stems and 1 from leaves. The spectroscopic analysis (UV, IR and NMR) shows that six compounds isolated from twigs fraction were identified as flavones structures (**1a-6a**)<sup>12,13</sup>, four products isolated from stems fraction identified as isoflavone structures (**7b-10b**)<sup>14,15</sup>, and one compound isolated from leaves extract attributed to the tannin class (**11c**).

**Pentamethoxy-6,7,8,3',4'-hydroxy-5 flavone (1a):** UV(MeOH): maxima at 281 and 342 nm, ESI-MS:  $m/z$  [ $MH^+$ ]: 389. NMR H: 12.70 (s, 1H), 7.63 (dd, 9Hz, 2Hz, 1H), 7.50 (d, 2Hz, 1H), 7.09 (d, 9Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H) NMR <sup>13</sup>C: 163.50 (C2), 103.45 (C3), 182.1 (C4), 148.49 (C5), 135.70 (C6), 152.40 (C7), 132.51 (C8), 145.00 (C9), 106.10 (C10), 122.60 (C1'), 111.70 (C2'), 149.00 (C3'), 152.30 (C4'), 109.05 (C5'), 119.90 (C6'), 60.50 (6-OMe), 61.70 (7-OMe), 61.50 (8-OMe), 55.71 (3'-OMe), 55.65 (4'-OMe).

**5,3',4'-Trimethoxy-7-hydroxy flavone (2a):** 163.24 (C-2), 103.77 (C-3), 181.75 (C-4), 151.02 (C-5), 98.78 (C-6), 164.15 (C-7), 132.90 (C-8), 146.63 (C-9), 116.07 (C-10), 122.82 (C-1'), 109.35 (C-2'), 148.93 (C-3'), 152.05 (C-4'), 111.60 (C-5'), 119.96 (C-6'), 55.60 (3'-OMe), 55.54 (4'-OMe).

TABLE-1  
EXTRACTION AND TLC ANALYSIS OF LEAVES, STEM AND TWIG FRACTIONS OF WATER-ACETONE EXTRACT (E1: ACETONE /TOLUENE/AC FORMIC 6/8/1, E2: ETHYL ACETATE/MeOH/WATER (10/1.5/1))

Leaves extract						
Fraction	Yield (%)	Colour fraction	$R_f$ (E1)	$R_f$ (E2)	Colour flurescent	$\lambda$ (nm) UV
Ethyl ether	0.30	Yellow	0.30	0.70	Purple	254
			0.49	0.80		
			0.57	0.90		
			0.69			
Ethyl acetate	0.62	Yellow enib	0.06	0.55	Purple	254
			0.13	0.60		
			0.20	0.80		
			0.27			
			0.46			
Butanol	0.81	Red brick	-	0.85	Purple	254
Stems extract						
Ethyl ether	0.15	Pale yellow	0.53	-	Violet	365
			0.66			
			0.77			
Ethyl acetate	0.46	Yellow	0.53	-	Violet	365
			0.66			
			0.77			
Butanol	1.51	Lemon yellow	0.57	-	Violet	365
Twigs extract						
Ethyl ether	0.37	Pale yellow	0.30	-	Violet	365
			0.50			
			0.60			
			0.66			
Ethyl acetate	0.48	Yellow	0.36	-	Purple	254
			0.50			
			0.60			
			0.66			
Butanol	0.34	Maron	0.30	-	Purple	365
			0.50			



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
<b>1a</b>	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H
<b>2a</b>	OMe	H	OH	H	OMe	OMe	H	H
<b>3a</b>	OH	H	OH	OH	OMe	OMe	H	H
<b>4a</b>	OH	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	H
<b>5a</b>	OH	H	OMe	H	OH	OMe	OMe	OG1
<b>6a</b>	OH	H	OMe	H	OH	OMe	OMe	OH
<b>7b</b>	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H
<b>8b</b>	OH	H	OH	H	OMe	OMe	H	H
<b>9b</b>	H	H	OMe	G2	H	OMe	H	H
<b>10b</b>	H	H	OH	G3	H	OMe	H	H

G1= Glucoside-6''-malonyl, 2''-ramnosyl

**5,7,8-Trihydroxy-3',4'-dimethoxy flavone (3a):** 161.84 (C-2), 104.89 (C-3), 176.78 (C-4), 161.35 (C-5), 113.84 (C-6), 150.47 (C-7), 132.90 (C-8), 146.63 (C-9), 116.86 (C-10), 123.77 (C-1'), 109.59 (C-2'), 148.92 (C-3'), 151.69 (C-4'), 111.67 (C-5'), 119.90 (C-6'), 55.67 (3'-OMe), 55.61 (4'-OMe).

**5,6,7-Trihydroxy-3',4'-5-trimethoxy flavone (4a):** UV (MeOH): maxima at 288 and 329 nm; <sup>13</sup>C NMR: 163.0 (C2), 102.8 (C3), 181.9 (C4), 147.0 (C5), 129.1 (C6), 153.3 (C7), 93.8 (C8), 149.6 (C9), 104.0 (C10), 122.70 (C1'), 111.73 (C2'), 149.00 (C3'), 152.20 (C4'), 109.0 (C5'), 119.90 (C6'), 55.70 (3'-OMe), 55.60 (4'-OMe), 55.71 (5'-OMe).

**3-O-(Glucoside-6''-malonyl, 2''-ramnosyl)-7,4',5'-trimethoxy-5,3'-dihydroxy flavonol (5a):** UV (MeOH): 281, 296, 334, IR (KBr,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393 (OH), 2951, 2923, 2862 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1711 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), 1640 (C=O, C-4), 1601 (C=C) 1514 (C=C arom), 1028, 1121 (C-O) <sup>1</sup>H NMR: 6.70 (H-6), 6.84 (H-8), 7.20 (H-2'), 6.93 (H-6'), 3.117, 3.057, 3.229 (O- $\text{CH}_3$ ) 3-glycosyl: 5.55 (H-1), 3.697 (H-2), 3.57 (H-3), 3.397 (H-4), 3.292 (H-5), 3.801 (H-Ga), 3.397 (H-G-b). 2''-ramnosyl: 5.21 (H-1), 4.702 (H-2'), 3.729 (H-3) 3.397 (H-4), 4.1 (H-5), 1.03 (H-6,  $\text{CH}_3$ ), 1.912, 1.988, 2.086, 2.177, 2.235, 2.027 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ). <sup>13</sup>C NMR: 162.24 (C-2), 129.9 (C-3), 174.06 (C-4), 151.67 (C-5), 129.9 (C-6), 140.1 (C-7), 99.79 (C-8), 158.44 (C-9), 105.91 (C-10), 122.53 (C-1'), 109.14 (C-2'), 140.1 (C-3'), 145.81 (C-4'), 137.81 (C-5'), 109.14 (C-6'), 47.77, 48.11,

48.44, 48.78 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3-glycosyl : 100.37 (C-1), 79.17 (C-2), 77.23 (C-3), 71.49 (C-4), 73.65 (C-5), 63.37 (C-6) 2''-ramnosyl: 102.62 (C-1), 72.68 (C-2), 72.35 (C-3), 75.07 (C-4), 70.43 (C-5), 18.3 (C-6), 6''-malonyl: 41.4 ( $\text{CH}_2$ ), 28.99, 30.07, 34.9, 38.68, ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ).

**5,3'-Dihydroxy-7,4',5'-trimethoxy flavonol (6a):** UV (MeOH): maxima at 286 and 312 nm, IR (KBr,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3410, 2934, 2847, 1689, 1558, 1430, 1377, 1115, 1033, 771. <sup>1</sup>H NMR: 6.75 (H-6), 6.89 (H-8), 7.19 (H-2'), 6.93 (H-6'), 3.12, 3.06, 3.23 (O- $\text{CH}_3$ ), <sup>13</sup>C NMR: 162.16 (C-2), 130.0 (C-3), 174.20 (C-4), 151.67 (C-5), 130.0 (C-6), 140.1 (C-7), 99.78 (C-8), 158.44 (C-9), 105.91 (C-10), 122.53 (C-1'), 109.0 (C-2'), 140.1 (C-3'), 145.81 (C-4'), 137.81 (C-5'), 109.0 (C-6'), 56.16 (7-OMe), 55.68 (5'-OMe), 55.69 (4'-OMe).

**6,7,8,3',4'-Pentamethoxy 5-hydroxy isoflavone (7b):** <sup>1</sup>H NMR: 8.03 (H-2, s), 7.11 (H-2', d, 1.51), 6.98 (H-5', d, 8.4), 6.97 (H-6', dd, 1.51, 8.4), 3.81 (4'-Me, s), 3.78 (3'-Me, s), <sup>13</sup>C NMR: 154.55 (C-2), 126.0 (C-3), 181.9 (C-4), 164.51 (C-5), 103.30 (C-6) 161.62 (C-7), 99.28 (C-8), 159.40 (C-9), 108.0 (C-10), 124.91 (C-1'), 117.33 (C-2'), 147.50 (C-3'), 149.40 (C-4'), 60.58 (6-OMe), 61.79 (7-OMe), 61.49 (8-OMe), 56.43 (4'-OMe), 55.67 (3'-OMe).

**5,7-Dihydroxy 3',4'-dimethoxy isoflavone (8b):** <sup>1</sup>H NMR: 8.12 (s, H-2), 6.57 (H-6, d, 2.0), 6.73 (H-8, d, 2.0), 7.06 (H-2', d, 1.50), 6.98 (H-5', d, 8.5), 6.9è (H-6', dd, 1.5, 8.5), 3.87 (4'-Me, s), 3.81 (3'-Me, s), <sup>13</sup>C NMR: 155.55 (C-2), 125.01 (C-3), 182.3 (C-4), 164.73 (C-5), 101.30 (C-6) 163.62 (C-7), 99.98 (C-8), 159.30 (C-9), 108.10 (C-10), 124.94 (C-1'), 117.31 (C-2'), 147.54 (C-3'), 149.40 (C-4'), 56.48 (4'-OMe), 55.68 (3'-OMe).

**Hexacetate 8-hydroxy-4',7-dimethoxy isoflavone 8-O- $[\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -glucopyranoside (9b):**  $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{O}_{20}$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  a  $m/z = 859$ , UV (MeOH): 212, 253, 306 nm. IR (KBr,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3404, 3235, 2918, 2841, 1629, 1514, 1377, 1115, 1039. <sup>1</sup>H NMR: 8.25 (s, H-2), 8.00 (d, 9.0, H-5), 7.50 (d, 8.5, H-2', H-6'), 7.27 (d, 9.0, H-6), 6.99 (d, 8.5, H-3', H-5'), 5.07 (d, 7.5, H-1''), 4.56 (d, 1.5, H-1'''), 4.03 (s, OMe), 3.82 (s, OMe) 3.84-3.37 (m, glucose and rhamnose protons), 1.06 (d, 6.5, H-6'''). <sup>13</sup>C NMR: 152.7 (C-2), 124.7 (C-3), 176.0 (C-4), 119.4 (C-10), 123.4 (C-5), 110.3 (C-6), 156.1 (C-7), 132.4 (C-8), 150.8 (C-9), 124.2 (C-1'), 130.5 (C-2', C-6'), 114.2 (C-3', C-5'), 159.9 (C-4'), 101.2 (C-1''), 72.1 (C-2''), 72.9 (C-3'') 69.2 (C-4''), 74.4 (C-5''), 66.5 (C-6''), 97.9 (C-1'''), 69.6 (C-2'''), 69.3 (C-3'''), 70.9 (C-4'''), 66.9 (C-5'''), 17.5 (C-6'''), 56.8 (7-OMe), 55.6 (4'-OMe), 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ). 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 19.9, 169.6 ( $\text{COCH}_3$ ).

**Tetraacetate 7,8-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone 8-O- $\beta$ -glucopyranoside (10b):** UV (MeOH): 211, 254, 306, IR (KBr,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3448, 2918, 2852, 1727, 1590, 1519, 1170, 1022, 1465, 716. <sup>1</sup>H NMR: 7.85 (s, H-2), 8.05 (d, 9.0, H-5), 7.05 (d, 9.0, H-6), 7.47 (d, 9.0, H-2', H-6'), 6.98 (d, 9.0, H-3', H-5'), 4.99 (d, 8.1, H-1''), 5.4 (dd, 9.8, 8.1, H-2''), 5.33 (t, 9.8, H-3''), 5.2 (t, 9.8, H-4''), 3.82 (ddd, 9.8, 5.6, 2.8, H-5''), 4.3 (dd, 12.6, 5.6, H-6''), 3.84 (s, 4'-OMe), 2.20, 2.12, 2.07, 2.06 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ). <sup>13</sup>C NMR: 151.3 (C-2), 125.1 (C-3), 175.6 (C-4), 118.7 (C-10), 124.3 (C-5), 115.3 (C-6), 154.4 (C-7), 131.1 (C-8), 150.2 (C-9), 123.5 (C-1'), 130.2 (C-2', C-6'), 114.1 (C-3', C-5'), 159.9 (C-4'), 103.4 (C-1''), 71.0 (C-2''), 72.1 (C-3'') 67.9 (C-4''), 72.7 (C-5''), 61.3 (C-6''), 55.4 (4'-OMe), 20.6, 20.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 17.6, 170.1, 169.3, 169.2 ( $\text{COCH}_3$ ).

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to MESRS and DGRST for the financial support given through this project.

**REFERENCES**

1. P. Quezel and S. Santa, *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques et Meridionales*, Tome II, édition CNRS, Paris (1963).
2. P. Ozenda, *Flore du Sahara*. Ed. CNRS: Paris, (1983).
3. A. Cheriti, *Plantes médicinales de la région de Bechar, sud ouest Algérie: Etude Ethnopharmacologique*. Rapport CRSTRA, Algerie, (2000).
4. N. Belboukhari and A. Cheriti, *Asian J. Plant Sci.*, **4**, 496 (2005).
5. N. Belboukhari and A. Cheriti, *Res. J. Phytochemistry*, **1**, 74 (2007).
6. A. Cheriti, N. Belboukhari and S. Hacini, *Iran. J. Pharm. Res.*, **3**, 51 (2004).
7. E. Camacho-Frias and A.P. Foucault, *Analisis*, **24**, 159 (1996).
8. K. Hostettmann, B. Domon, D. Schaufelberger and M. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, **283**, 137 (1984).
9. J.B. Harborne, (1986). *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London.
10. M.O. Hamburger and G.A. Cordell, *J. Nat. Prod.*, **50**, 19 (1987).
11. K. Hostettman, A. Marston and M. Hostettman, (1998), *preparative chromatography techniques. Applications in natural product isolation*, 2<sup>nd</sup> ed, Springer, Berlin Heidelberg.
12. J.D. Bacon and T.J. Mabry, *Rev. Latinoam. Quim.*, **7**, 83 (1976).
13. T.J. Mabry, K.R. Markham and H.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*. Springer Verlag, Heidelberg, New York (1970).
14. C.C.W. Wanjala and R.R.T. Majinda, *Fitoterapia*, **71**, 400 (2000).
15. K.R. Markham and H. Geiger, in ed: J.B. Harborne, *<sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of Flavonoids*, *Advances in Research Since 1986*, pp.1-676, Chapman & Hall, London (1994).



## EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE D'EXTRAITS AQUEUX DE FEUILLES *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA)

RAHMANI Smahia<sup>1</sup>, BELBOUKHARI Nasser<sup>1</sup>, SEKKOUM Khaled<sup>1</sup>, CHERITI Abdelkrim<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> *Laboratoire des Molécules Bioactives et Séparation Chirale (LMBSC)*  
*Université de Bechar, Béchchar, Algérie*

<sup>(2)</sup> *Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique (LPSO)*  
*Université de Bechar, Béchchar, Algérie*

E-mail: [belboukhari.nasser@yahoo.com](mailto:belboukhari.nasser@yahoo.com)

**Résumé.-** L'objectif du travail était d'étudier l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles de *Limoniastrum feei* afin de valoriser son utilisation en médecine traditionnelle. La dose de 25mg /kg de l'extrait aqueux des feuilles réduit significativement l'œdème de la patte de la souris induit par le formol par une diminution de l'inflammation par rapport au diclofénac, de (85% et 95%) respectivement.

**Mots clés:** *Limoniastrum feei*, anti-inflammatoire, œdème

### EVALUATE THE ANTI INFLAMMATORY OF THE OF THE AQUEOUS EXTRACT FROM LEAVES OF *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA)

**Abstract.-** The objective of the study was to evaluate the anti-inflammatory of the aqueous extract of the leaves of *Limoniastrum feei* in order to enhance its use in traditional medicine. The dose of 25mg / kg of the aqueous leaves extract significantly reduced the paw edema of mouse induced by formalin in a reduction of inflammation relative to diclofenac, of (85% and 95%) respectively.

**Key words:** *Limoniastrum feei*, anti- inflammatoir, edema

### Introduction

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours [1].

En Algérie la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de

vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes. Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles de *L. feei*.

*L. feei* appartient à la famille des Plumbaginacées. Il s'agit d'une espèce dite saharo-arabique stricte, qui croît dans tout le Sahara septentrional algérien et marocain [2].

Différentes parties de *L. feei* sont employées en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Il est principalement utilisé contre les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques. Elle est aussi utilisée comme antibactérien [3].

Pour étudier l'activité de la plante après une inflammation aiguë, un œdème local provoqué par le formol dans la patte de souris [4].

## **1.- Matériels et méthodes**

### **1.1.- Matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *L. feei* dont l'identification a été réalisée au Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique de l'Université Tahri Mohammed de Béchar. L'extrait aqueux est préparé par extraction Soxhlet 25 grammes de poudre dans 150 ml d'eau distillée pendant 6 heures. Après la décantation le surnageant est filtré et le filtrat est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif (Buchi) . Le filtrat a été lyophilisé au lyophilisateur type (Christ Alpha 1-2 LD plus) . Le rendement de l'extrait aqueux est de 45,4 % . Cet extrait sera rendu soluble dans l'eau physiologique .

### **1.2.- Matériel animal**

Les expériences ont été réalisées chez des souris de souche Swiss albinos, de poids compris entre 25g et 43 g. Les souris ont été réparties au hasard en 3 lots homogènes de 3 souris.

### **1.3.- Réactifs**

Solution de formol à 1% dans du sérum physiologique, extraits aqueux de feuilles de *L. feei*, acide 2-[2-(2,6-dichlorophenyl) amnophényl] éthanoïque (diclofenac), comme anti-inflammatoire de référence.

### **1.4.- Appareillage**

Pléthysmomètre (LE 7500 pléthysmomètre, Barcelona SPAIN) pour mesurer le volume de la patte de souris.

## 1.5.- Protocole expérimentale

### 1.5.1.- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'œdème est provoqué par l'injection dans l'aponévrose de la plante du pied d'une solution de formol à 1% [5]. Selon laquelle l'inflammation est induite par injection de formole au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du souris. L'œdème causé par cet agent phlogogène sera traduit en volume et mesuré par le Pléthysmomètre ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire. Pour chaque essai de l'activité anti-inflammatoire, trois lots de trois souris ont été utilisés. Ces souris ont été mises à jeun, 17 heures avant l'essai.

- Lot témoin : Les souris de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) par voie intra-péritonéale (ip), 30 mn avant l'injection de formole (25 ml/kg; 1%) dans la voûte plantaire de la patte droite du souris.

- Lot référence : Les souris de ce lot ont été traités par voie (ip) avec un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique, 30 mn avant l'injection de la formole. L'administration de l'anti-inflammatoire se fait à raison de 25mg/kg .

- Lot essai : L'extrait à tester est administré aux souris par voie ( ip) à raison de 25 mg/kg ; 30 mn avant l'injection de formol.

Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait par mesure des deux pattes : une patte traitée P(t) et une patte non traitée P(nt), et ceci à 0. 30, 60, 120, 180 mn après injection du formol.

L'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évolution ont été estimées par la détermination des pourcentages moyens d'inhibition de l'œdème, calculés suivant la formule.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(V_t - V_0)_{\text{témoin}} - (V_t - V_0)_{\text{traité}}}{(V_t - V_0)_{\text{témoin}}} \times 100$$

- $V_0$  représente le volume de la patte à  $t=0$  (avant injection du formol),
- $V_t$  représente le volume de la patte à un temps  $t$  quelconque.

## 1.6.- Analyse statistique

Les résultats ont été analysés par le test t de Student. Les valeurs de  $p < 0,05$  a été considérées comme significatives.

## 2.- Résultats et discussion

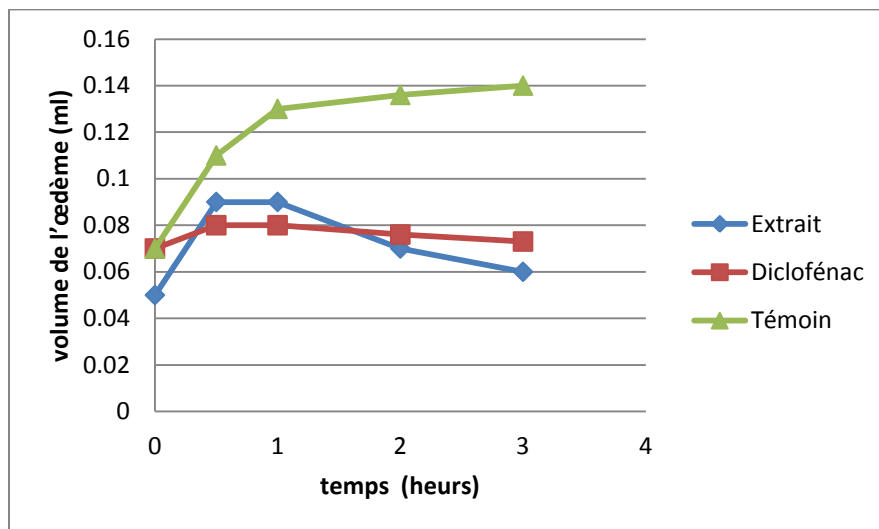
### 2.3.3.- Activité anti-inflammatoire

#### Criblage de l'activité antiœdémateuse

L'étude a été conçue pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des feuilles de la plante *L. feei*, Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par le formol à 1%. Il est

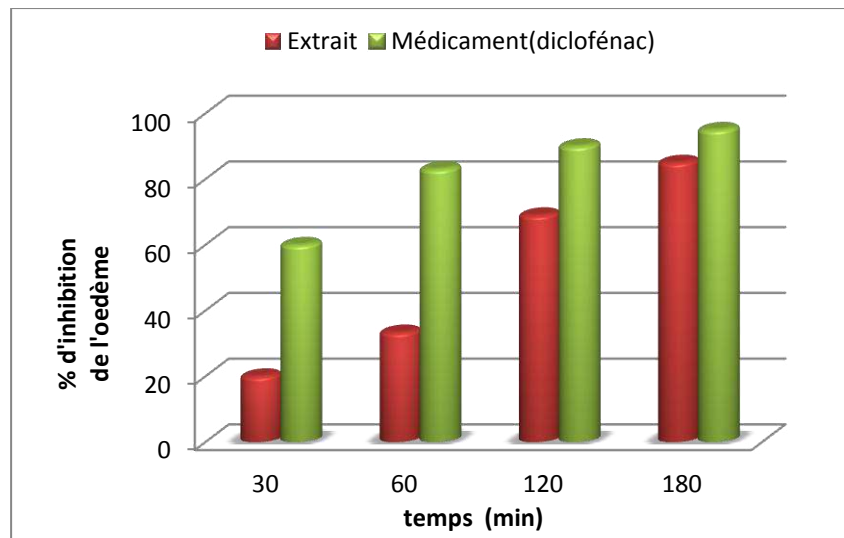
testé sur ce modèle les extraits aqueux, à la dose de 25 mg/kg en administration par intra-péritonéale. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le diclofénac qui est un anti-inflammatoires non stéroïdiens et à ceux du contrôle physiologique. Après l'injection de l'eau physiologique, le formol entraîne une augmentation significative du volume de la patte de souris de  $0,11 \pm 0,005$  de  $0,13 \pm 0,01$  et de  $0,136 \pm 0,01$  et de  $0,14 \pm 0,02$  respectivement à 30 mn, 60 mn et 120 mn et 180mn.

L'injection de diclofénac à la dose de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  par voie i-p prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte de souris. Elle est de  $0,09 \pm 0,02\%$ , de  $0,08 \pm 0,01\%$  et de  $0,076 \pm 0,005$  et  $0,073 \pm 0,005$  à 1 et 3 h après l'injection du formol. En ce qui concerne les extraits aqueux, ont été faits pour empêcher l'augmentation du volume de la patte de souris. Elle est de  $0,09 \pm 0,011$ , de  $0,07 \pm 0,010$ , et de  $0,06 \pm 0,01$ , pendant à 1.30 et 3 h après l'injection de formol. Ces résultats sont significativement différents de ceux du contrôle physiologique. (fig. 1).



**Figure 1.-** Evolution de l'œdème ( $m \pm E.T$ ) en présence d'un prétraitement par voie intra-péritonéale, après l'injection de le formol (0,025 ml; 1%), Chaque point représente une moyenne de 3 souris

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que l'extrait aqueux de *L. feei* possède une activité anti-inflammatoire. A la deuxième heure l'extrait aqueux à la dose de 25 mg/kg montre respectivement un pourcentage d'inhibition de  $20 \pm 0,007\%$ , et de  $33.33 \pm 0,01\%$ , et  $69 \pm 0,03\%$  et de  $85 \pm 0,04\%$ . Cette inhibition de l'œdème a été moins efficace que ceux obtenus avec diclofénac au cours de la même période (fig. 2). En dépit de cela, nous pouvons dire que L'extrait aqueux de feuilles de *L. feei*, présente une activité anti-inflammatoire.



**Figure 2.-** Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris, induit après les traitements lors du test de l'activité antiœdémateuse de l'extrait aqueux des feuilles de *L-fee*

Les études phytochimiques ont permis de caractériser dans les feuilles de *L. feei* des tanins; des stérols; des terpenoïdes ; des flavonoïdes; des saponines et une absence des alcaloïdes [6]. Les organes de *L. feei* sont riches en substances polyphénoliques [7].

Les résultats obtenus à l'issue des tests antiinflammatoires montrent que les extraits aqueux des feuilles de *L. feei*, réduisent de façon appréciable l'œdème induit par le formol. L'inhibition de l'œdème de l'extrait aqueux de la plante est comparable, à celle de diclofénac. La richesse de l'extrait aqueux de la plante en différents constituants chimiques peut justifier cette activité.

Dans les conditions expérimentales le formole a provoqué l'œdème dont le volume est maximal au bout de trois heures [8, 10]. Le formole provoque l'inflammation locale lorsqu'il est injecté dans l'aponévrose de la plante du pied [5, 11 ,12] tout comme la carragénine [13,14]. La cause de cette réaction inflammatoire est la lésion tissulaire. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes [15], du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO (monoxyde d'azote) et du TNF (facteur de nécrose tumorale) [16]. Les effets d'extraits aqueux de *L. feei* sur l'œdème s'expliqueraient par l'inhibition de la synthèse des substances pro-inflammatoires.

## Conclusion

L'effet anti-inflammatoire d'extraits aqueux de *L. feei* a été évalué dans le présent travail. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède une activité antiinflammatoire. En effet, lors du test d'inhibition du développement de l'œdème de la patte induit par le formol chez la souris permet de conclure que l'extrait aqueux des feuilles de *L. feei* possède un effet anti-inflammatoire significativement à celui de diclofénac. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *L. feei* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires.

## Références bibliographiques

- [1].- Gaziano J. M., Gibson C. M., 2006.- Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *Am J Cardiol*, 97 : 23-9.
- [2].- Ozenda., 2004.- Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris, 624 p.
- [3].- Belboukhari N., Cheriti A., 2005.-Antimicrobial Activity of Aerial Part Crude Extracts from *Limoniastrum feei* . *Asian J. Plant Sci*, 4(5):496-498
- [4].- Winter C. A., Risley E. A., Nuss G. W., 1962.- Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med* , 111: 544–547
- [5].- Sen T.; Nag C. A. K., 1991.- Antiinflammatory evaluation of *Pluchea indica* root extract. *J. of Ethnopharmacology*, 33: 135-141.
- [6].- Rahmani S., Ziane L., Belboukhari N., Cheriti A., 2012. -The Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*: Ethnomedical survey and preliminary phytochemical screening of antibacterial extracts. *PhytoChem & BioSub Journal*, 6(2): 83-87.
- [7].- Rahmani S., Belboukhari N., Cheriti A., Bourmita Y., Ould El Hadj M. D., 2013.- Glucoside flavonoids from the antimicrobial extract of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. *Biochemistry An Indian Journal*, 7 (4): 137-140.
- [8].- Singla A. K.; Pathak k.,1990.- Topical antiinflammatory effects of *Euphorbia prostrata* on carrageenan-induced footpad oedema in mice . *Journal. of Ethnopharmacology*, 29: 291-294.
- [9].- Ivanovska N.; Philipov S.; Istatkova R., 1997.- Evaluation of anti-inflammatory activity of plants used in Bulgarian folk medicine . *Fitoterapia*, LXVIII (5): 417-422.
- [10].-Viana C. F. G.; Aragao A. G. M.; Ribeiro R. A.; Magalhaes J. F. G.; Yale M . R., 1998.- Effectsof *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammation response induced by zymosan . *Fitoterapia*, LXIX (4): 349-354.
- [11].- Singh S.; Bani S.; Singh S. B.; Gupta B. D.; Banerjee S. K.; Singh B.,1997.- Antinflammatory activity of *lupeol*. *Fitoterapia*, LXVIII (1): 9-16.
- [12].- Suzuki T.; Kishimoto Y.; Misawa M., 1996.- Formalin-and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Science*, 59: 1667-1674.
- [13].- Bhatt K. R.; Mehta R. K.; Shrivastana P. N., 1977.- A simple method of recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema .*Indian I. of Physiology and Pharmacology*, 21: 399-400.

- [14].- Ossipov M. H.; Kovelowski C. J.; Porreca F., 1995.-The increase in morphine antinoceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrindole, a selective delta-opioid antagonist . *Neuroscience Letter*, 184: 173-176.
- [15].- Ammon H. P. T.; Safayhi H.; Mack T.;Sabieraj J., 1993.- Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boric acids. *Ethnopharmacology*, 38:113-119.
- [16].- Clarke J. M.; Sabrena M. B.; Edward C.; Jo Rae W.,1996.- Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *American Journal of Physiology*, 271:310-319.