

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Université Kasdi Merbah-Ouargla
Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière
Département de Chimie**



Mémoire

Présenté pour l'Obtention du diplôme de Master Académique

Spécialité : Chimie

Option : Chimie organique

Par : Belabes Rima & Djedira Taouabe

Thème:

**Extraction des Flavonoïdes et évaluation de
l'efficacité Antioxydant d'une plante algérienne**

Soutenu le : 30 /06/2019 devant le jury:

Zaoui Manale	M.C.A	Présidente
Allaoui Messaouda	M.C.A	Examinatrice
Mekhelfi Tarak	M.C.A	Rapporteur
Khelassi Asma	M.C.B	Co-Rapporteur

Année universitaire: 2018/2019

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.

Et ceux à qui je dois tant

*A mes parents pour leur amour et leur support continu ;
Saïdane Nacira et Kouïder*

A mes sœurs : Selma, Nour Elhouda, Asmahane, Manal

A mon Frère :Farid

A tous ma famille en particulier ma grand-mère

*A les enfants de ma sœur Faïde rahmane ; Ghâïthe allah ;
Rinade.*

*A tout la promotion Chimie organique et produit chimie
naturel : 2018/2019*

Rîma BLB

Remerciement

Nous tenons d'abord à remercier Monsieur Mekhelfi Tarak pour avoir accepté d'être le promoteur de notre mémoire, pour sa disponibilité son sérieux et sa rigueur scientifique mais aussi pour sa gentillesse et sa simplicité

Nous remercions très sincèrement Madame Zaoui Manale d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce mémoire

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Le enseignement Allaoui Messaouda pour l'intérêt qu'elle apporté à ce travail en acceptant de l'examiner ainsi que pour sa gentillesse et ses avis scientifique pertinents

Nous remercions tous ceux qui sont dans le laboratoire VPRS et toute l'équipe du Laboratoire de chimie Analytique de l'université KASDI Merbah -Ouargla-, Monsieur Makaoui et Abbas, Hanane, Asma et Anissa aussi pour la confiance et l'encouragement.

Mes sincères remerciement a mes amies: Ibtisame, Chahra et Abdeldjabar pour leur soutient et leur aide.

Enfin, nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les gens formidable qui nous aidons.

Sommaire :

	La page
Le titre	
Introduction générale	1
La partie théorique	
Chapitre I: L'étude théorique de la plante	
I-1-introduction	4
I-2-Description botanique	
I-3-Classification systématique de la plante <i>S.Vermeculata</i>	5
I-4-Etude chimique antérieure sur la plante <i>S.Vermeculata</i>	
I-4-1-Les terpènes	
I-4-2-Les huiles essentielles	6
I-5-Propriétés pharmacologiques	7
I-5-1-Utilisation en médecine traditionnelle	
I-6-Quelques activités biologiques reconnues	
Chapitre II : Les métabolites secondaires	
II-1-Introduction	9
II-2-Les terpènes	
II-3-Les composés phénoliques et les flavonoïdes	10
II-3-1-Les composés phénoliques	
II-3-1-1-Classification des polyphénols	11
A-Les stilbénes	
B-Les les acide phénolique	12
C-Les lignanes	13
II-3-2-Les flavonoïdes	
II-3-2-1-Généralité et définition	
II-3-2-2-Classification des flavonoïdes	14
II-3-2-3-La chimie des flavonoïdes	15
A- La biosynthèse des flavonoïdes	
B-Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes	17
II-3-2-4-L'extraction	
II-3-2-5-Détection des flavonoïdes	18
A-Test préliminaires des Flavonoïdes	
II-3-2-6-Séparation et purification	19
II-3-2-7-Characterisation structural	20
A-Facteur de retardement chromatographique	

B-Fluorescence sus lumière de Wood	21
C-La spectrophotométrie UV-Visible	22
D-Chromatographie et la séparation sur la CCM préparatoire	
❖ Spectre méthanolique	
❖ Addition des réactifs (la série spectrale)	23
II-3-2-8-Les techniques d'identification Structurale	25
A-La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	26
B-RMN monodimensionnelle	
C- RMN H1	
❖ Les déplacements chimique des différents protons du cycle A et B du squelette flavonoïque	
❖ Les déplacement chimique de Proton du noyau C	27
❖ Les déplacement chimique du Protons méthoxyles	28
❖ Les déplacement chimique du Protons de sucres	
II-3-2-9-RMN C13	
II-3-2-10-RMN bidimensionnelle	29
II-3-2-11-Spectrométrie de masse	30
A-Pour les flavonoïdes glycolyses	
II-3-2-12-Couplage des techniques chromatographique avec des techniques Spectroscopiques	
A-Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes	31
II-3-2-13-Le rôle des physiologiques des flavonoïdes	
A- Les flavonoïdes comme antioxydants	
B-Distribution et localisation des flavonoïdes	
II-3-3-Les alcaloïdes	32
II-3-3-1-Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes	33
II-3-3-2-La Solubilité	
II-3-3-3-Utilisations des alcaloïdes par l'homme	
 Chapitre III: Matériels et méthodes	
III-1-l'étude phytochimique de la plante	37
III-1-1-Récole de matériel végétal	
III-1-2-L'extraction	
III-1-3-Etude quantitative	39
III-1-4-Les tests préliminaires phytochimiques	
III-1-5-Séparation et pétrification	40
III-1-5-1-Préparation de la plaque CCM	41
A- La phase stationnaire	
B- Les échantillons	
C- Les analyses préliminaire	42
III-1-6-La chromatographie sur colonne	
III-1-6-1- La phase stationnaire	

III-1-6-2-La phase mobile	43
III-2-Dosage des extraits	
III-2-1-Dosage des polyphénols totaux	
A-Détermination de la concentration en composés phénoliques	
III-2-2-Dosage des flavonoïdes	44
III-2-3-Dosage des tanins condensé	
III-3-Étude de l'efficacité antioxydant des extraits	<u>45</u>
III-3-1-Activité antioxydant totale (TAC)	
A-Définition la méthode de (TAC)	
B-Le Principe de TAC	
III-4-Activité antibactérienne	46
III-4-1-Les souches bactérienne choisi	
III-4-2-Préparation des extraits	
III-4-3-Stérilisation	47
III-4-4-Les étapes de l'activité antibactérienne	48
III-4-5-Méthode de micro-dilution en milieux liquide	
Chapitre IV: Résultats et discussion	
IV -1-Les études phytochimiques	50
IV -1-1-Les tests préliminaires	
IV -1-2-Résultats de la séparation et purification	
IV -1-3-Les résultats de l'estimation quantitative	51
A-Dosage des polyphénols totaux	
B-Dosage des flavonoïdes	52
C-Dosage des tanins condensés	53
IV-1-4-Les résultats de l'étude de l'activité antioxydant	54
IV-1-4-1-Activité antioxydant totale (TAC)	
IV-1-5-résultats de l'Activité anti bactérienne	56
Conclusion générale	58
Les références	59

Liste des figures:

Chapitre I	
Figure (I)- La photo de la plante <i>s.vermeculata</i> .	5
Chapitre II	
Figure (II-1)- L'arrangement naturel le plus fréquent de l'unité isoprène.	10
Figure (II-2)- Les principales classes des polyphénols.	11
Figure (II-3)- Structure de base des stilbènes (trans ou cis).	12
Figure (II-4)- Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamique.	12
Figure (II-5)- Structure des lignanes.	13
Figure (II-6)- Squelette général des flavonoïdes.	14
Figure (II-7)- Les principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes.	16
Figure (II-8)- Les bandes caractéristiques d'un squelette flavanoïque.	23
Figure (II-9)- Représentation des éléments structuraux des flavonoïdes importants pour la neutralisation des radicaux.	32
Chapitre III	
Figure (III-1)- Protocole d'extraction des polyphénols et les flavonoïdes.	38
Figure (III-2)- Séparation de la fraction (F14) sous la lampe UV ($\lambda=250\text{nm}$).	42
Figure (III-3)- La courbe standard de l'acide gallique.	44
Figure (III-4)- La courbe standard de la quercitine.	44
Figure (III-5)- La courbe d'étalonnage de la catéchine.	45
Figure (III-6)- La courbe standard de phosphomolybdène.	46
Chapitre IV	
Figure (IV-1)- Le résultat de la séparation la fraction (F14*) sous la lumière UV	51
Figure (IV-2)- Teneurs en polyphénol totaux.	52
Figure (IV-3)- Teneurs en flavonoïdes totaux.	53
Figure (IV-4)- Teneur en tanins condensés.	54
Figure (IV-5)- Les courbes de la capacité totale antioxydant des extraits.	55
Figure (IV-6)- Des images des résultats de l'activité anti bactérienne	56

Liste les tableaux:

Chapitre I	
Tableaux (I-1)- Classification systématique de la plante <i>S.vermeculata</i> .	5
Tableaux (I-2)- Les structures des terpènes.	6
Chapitre II	
Tableaux (II-1)- Différentes classes Structure des squelettes des principaux groupes flavonoïdes.	14
Tableaux (II-2)- Les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH ₃ .	19
Tableaux (II-3)- Les systèmes les plus utilisés pour la séparation des flavonoïdes par CCM.	20
Tableaux (II-4)- La relation entre Rf et la structure.	21
Tableaux (II-5)- Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavanoïque.	21
Tableaux (II-6)- Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.	23
Tableaux (II-7)- Les principaux déplacements des bandes I et II .	25
Tableaux (II-8)- Les déplacements chimique des protons du cycle (A).	27
Tableaux (II-9)- Les déplacement chimique des protons du cycle (B).	27
Tableaux (II-10)- Les valeurs du déplacement chimique de quelques sucre dans le DMSO.	28
Tableaux (II-11)- Les déplacements chimiques de quelques carbones.	29
Tableaux (II-12)- Les techniques RMN bidimensionnelles les plus importantes utilisées dans la détermination structurale des flavonoïdes de tous les types .	29
Tableaux (II-13)- Les alcaloïdes et les indication thérapeutique.	34
Chapitre III	
Tableaux (III-1)- Les poids des phases et leurs rendement d'extraction.	39
Tableaux (III-2)- La résumer des tests préliminaires des familles chimiques.	40
Tableaux (III-3)- Les résultats de l'analyse initiale sur les plaques CCM.	41
Tableaux (III-4)- Colonies bactériennes étudier.	47
Chapitre IV	
Tableaux (IV-1)- Résultats des tests préliminaires.	50
Tableaux (IV-2)- Le résultat de quantification des polyphénols.	51
Tableaux (IV-3)- Le résultat de quantification des flavonoïdes.	52
Tableaux (IV-4)- Le résultat de quantification des tanins.	53
Tableaux (IV-5)- La concentration des extrais correspondant de TAC	55
Tableaux (IV-6)- Les résultats de l'activité anti bactérienne.	56

Abréviation symboles :

AcOEt : Acétates d'éthyles.

AcOH: Acide acétique a différentes concentrations.

AlCl₃: Chlorure d'aluminium.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

Aq: Aqueux

Ba: Bacillus subtilis.

CCM: Chromatographie sur couche mince .

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CPG: Chromatographie en phase gazeuse.

CC: Chromatographie sur Colonne.

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance.

CP: Chromatographie sur Couche Mince préparative.

COSY: Correlation spectroscopy.

DMSO: Diméthyle sulfoxyd.

E-P: Ether de pétrole.

E-coli: Escherichia coli.

EtOH: Ethanol.

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

EQE/g: Milligramme d'équivalent quercitrine par gramme du poids sec de la plante.

EAC/g: Milligramme d'équivalent catéchine par gramme du poids sec de la plante.

GC: Chromatographie en phase gazeuse.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

H₂O: Eau.

HSQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence.

HMBC: Heteronuclear Multiple bond Coherence.

H₂SO₄: Acidesulfurique.

HCl: Acide Chlorhydrique.

H₃BO₃: Acide Borique.

Hex: Hexane.

KCl: Chlorure de Potassium.

MeOH: Méthanol.

n-but: n-butanol.

NaOAc: Acétate de sodium.

NaOH: Soude.

Min: Minute.

Mm: Millimètre.

Nm: Nanomètre.

Mm: Millionaire.

MEC: Methylethylketone

NOESY: Nuclear Overhauser effect spectroscopy.

NH₃: Amoniac.

PPm: Parties par millions.

Pseud: Pseudomonas aeruginosa.

RMN 2D: Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle.

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire.

RMNH1: Résonance Magnétique Nucléaire du H 1.

Rf: Rapport frontal (facteur de retardement)

R%: Rendement.

F: La Fraction.

SM: Spectrométrie de Masse.

Staph: Staphylococcus aureus.

TAC: Total antioxydant activité.

Tol: Toluène.

UV: Ultrat-Violet.

λ: Longueur d'onde.

Q: La phase.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



**INTRODUCTION
GÉNÉRALE**

Introduction générale:

Depuis l'aube des temps, l'homme a utilisé les plantes qu'il a sa disposition à des fins médicinales pour se soigner.

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories: les molécules glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques. Les métabolites secondaires sont des ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante.

Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies [1], et sont d'une variété structurale extra ordinaire mais sont produits en faible quantité.

Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques.

Les plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs millénaires. La curiosité et le principe innés de la doctrine de signature préconisée par Paracelsus (1493–1541) qui, indiquant la possibilité d'identification des particularités et vertus de chaque plante par sa " signature " (forme, couleur), ont guidé les premiers hommes dans le choix des nouvelles préparations devant être testées [2].

Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde [3]. L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches la plus fiable pour la découverte de nouveaux médicaments.

Plusieurs plantes ont été identifiées comme ayant un potentiel antioxydant[4,5]. Les phénols, en particulier les bio-flavonoïdes, sont très intéressants par leur propriété antioxydant en raison de leur origine naturelle et de leur capacité d'agir comme piègeurs de radicaux [6,7].

L'Organisation mondiale de la santé estime que les extraits de plantes ou leurs ingrédients actifs sont utilisés dans des médicaments par plus de 80% de la population mondiale [8]. Plus de 50% de tous les médicaments cliniques modernes sont des produits de L'origine naturelle et les produits naturels jouent un rôle important dans les programmes de développement de médicaments dans le secteur pharmaceutique Industrie [9].

De nombreux chercheurs du monde entier ont étudié les effets d'extraits de plantes dans les microorganismes [10].

Salsola vermiculata L. (membre de la famille des Chenopodiaceae) fait partie des espèces dominantes [11].

Les travaux que nous avons effectués sur *S.vermeculata* sont reportés dans cette mémoire sous forme de quatre chapitres :

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



CHAPITRE I :
L'ÉTUDE THÉORIQUE
DE LA PLANTE

I-1- Introduction :

Salsola vermiculata L. (*J. Chem. Pharm. Res*) du peloton composite (amaranthaceae = chenopodiaceae) est une espèce pérenne en zone méditerranéenne aride. Cette espèce est distribuée dans tout le Moyen-Orient et le Nord Afrique y compris l'Algérie, l'Égypte, l'Iran, Israël, la Jordanie, le Liban, la Libye, le Maroc, les îles méditerranéennes de Sardaigne et Sicile, Espagne, Syrie et la Tunisie [12].

Salsola vermiculata L. a plusieurs noms vernaculaires en Algérie **Nom scientifique:** *Spergulia Rubra* Ljet Pest, **Arabe:** bsate Imlouke et **Français:** SABLINE ROUGE.

I-2- Description botanique:

Salsola vermiculata L. (membre de la famille des Chenopodiaceae) fait partie des espèces dominantes, Plante très polymorphe, à feuilles linéaires, courtes terminées en point. Elle est sans odeur fétide. Les ailes du fruit sont grandes et plus ou moins colorées; elle est retrouvée dans les terrains salés, falaises maritimes, pâturages arides et désertiques Il fleurit en octobre [13-14].

C'est une espèce pérenne en zone méditerranéenne aride. Cette espèce est distribuée dans tout le Moyen-Orient et le Nord Afrique, y compris l'Algérie, l'Égypte, l'Iran, la Jordanie, le Liban, la Libye, le Maroc, les îles méditerranéennes de Sardaigne et Sicile, Espagne, Syrie et Tunisie [15].

I-3- Classification systématique de la plante: *S.vermeculata*

Tableau (I-1): Classification systématique de la plante *S.vermeculata* [16].

Règne	Plante
Embranchement	Magnoliophyts
Classe	Magnoliopsids
Famille	Amaranthaceae (=chenopodiaceac)
Ordre	Caryophyllales
Genre	Salsola
Espèce	Salsola Vermeculata



Figure (I-1): Photo de la plante *S.vermeculata*

I-4-Etudes chimiques antérieures sur la plante de *S.vermeculata*.


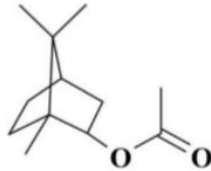
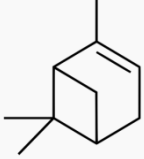
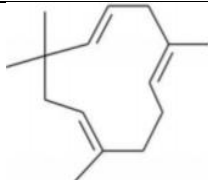
Des types rares ont été détecté des métabolites secondaires de *S. vermeculata* en raison de la rareté des études sur ce type, où la plupart étaient des huiles essentielles, terpénoïdes, des sesquiterpènes. Selon notre recherche bibliographique les flavonoïdes, les acides phénoliques, Les coumarines et les alcaloïdes n'ont jamais été isolés de cette plante [11].

I-4-1- Les terpènes:

Les terpènes déjà isolés de la plantes *S.vermeculata* sont des mono terpènes oxygénés, et un alcool sesquiterpène que sont [16]:

α -pinene (1), Camphene (2), β -pinene (3) , 1,8-cinéole (4), Linalool (5) .

Tableaux(I-2) : Les structures des terpènes :

La plante			Nom	La structure	Référence
Les feuilles	Les tiges	Les racines			
0.6	0.9	0.5	β -pinene		22
1.0	0.7	0.7	1,8-cinéole		22
1.3	-	1.1	α -pinene		22
-	0.4	0.6	α - humulene		22

I-4-2- Les huiles essentielles :

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

1- La fraction volatile **des feuilles** de *S. vermiculate* contient 28 composés représentant 95,9% du total constituants. Les principaux composés de cette fraction sont la carvone (52,2%), le cumin aldéhyde (6%), le β -caryophyllène (5,8%) et le linalol (7,1%) [16].

2- **Les tiges** représentant 98,5% du total des constituants. Cette fraction volatile est dominée par le carvone (53%), le limonène(17,4%), le linalol (11,3%) et le β -caryophyllène (7,5%) [17].

3- Dans la fraction volatile **des racines**, 33 constituants ont été identifiés et représentent 94,2% du total des constituants. Les composés majoritaires sont la carvone (49,9%), le β -caryophyllène (8,5%), le linalol (8,2%) et le cumin aldéhyde (4,4%) [16,17].

Les monoterpènes oxygénés (67,8%, 69,4% et 64,6%) constituent respectivement la classe dominante des fractions volatiles de feuilles, tiges et racines de *S. vermiculate*.

Le principal composant de cette classe est le carvone [16,17].

I-5-Propriétés pharmacologiques du *S.vermiculata*:


L'espèce *s.vermiculata* est une source riche d'huile essentielle, plusieurs analyses ont été fréquemment employées pour évaluer les capacités antioxydants et les propriétés antidiabétiques, Infection de la vessie et de diabète [18].

I-5-1-Utilisation en médecine traditionnelle:

Cette plant est utilisée dans le traitement du diabète, traitement de douleurs articulaire, traitement des reins, infection de la vessie et aussi dans la fabrication de savon.

I-6-Quelques activités biologiques reconnues :

Plusieurs études ont été fréquemment réalisée pour évaluer les capacités antioxydants et les propriétés antidiabétiques de ce huiles essentielle Où il a été constaté plusieurs capacités antimicrobiennes, antifongique ,et antidiabétique [19-21].



CHAPITRE II
LES MÉTABOLITES
SECONDAIRES

II-1-Introduction:

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs industries telles que l'industrie cosmétique, agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique [23].

Les métabolites primaires sont des composés qui ont des rôles essentiels liés à la photosynthèse, la respiration, et la croissance et le développement. Plus le métabolisme secondaire qui est défini comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, Il existe une grande variété de métabolites secondaires pouvant avoir des structures chimiques diverses et complexes et de très nombreuses activités biologiques. On peut citer la capacité à tuer ou inhiber la croissance des bactéries (antibiotiques), des champignons (antifongiques) ou d'autres organismes eucaryotes, tels des protistes ou des helminthes (antiparasitaires).

D'autres composés peuvent un rôle dans la régulation du métabolisme de l'organisme Certaines molécules peuvent également servir à la communication entre cellules. La plupart des métabolites secondaires sont des produits dans les plantes [24]. En fonction de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois groupes principaux: (1) les terpénoïdes, (2) flavonoïdes et composés phénoliques, (3) les alcaloïdes contenant de l'azote et les composés contenant du soufre [25].

II-2-Les terpènes:

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due a la libération des molécules très volatiles [25].

Résultant formellement d'un assemblage d'unités « isoprène » (5 carbones)_n. de nombre produits naturels de cette famille présentent une fonction oxygénée dans les végétaux , les extraits sous forme d'huiles essentielles ils constituent l'une des bases industries des parfumes, des arômes. L'unité isoprène comme décrit ci-dessous [26] :

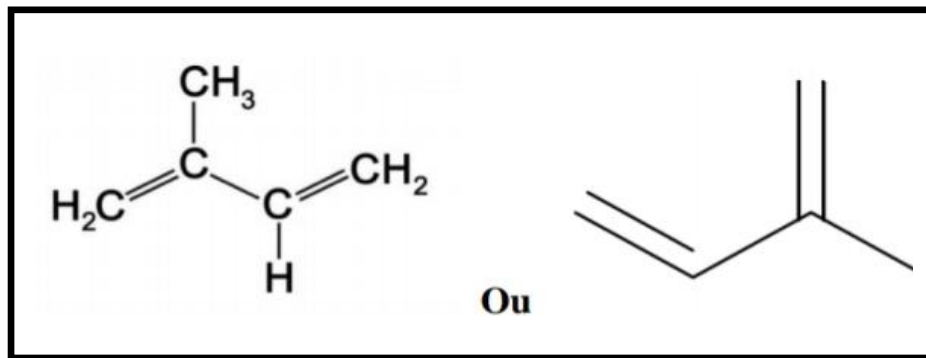


Figure (II-1): l' arrangement naturels de l'unité isoprène

II-3-Les composés phénoliques et les flavonoïdes :

II-3-1- Les composés phénoliques :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [27].

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues dans la règne végétal. Les scientifiques en ont identifié plus de 8000, allant de molécules simples à des composés complexes [28].

Les polyphénols possèdent des propriétés biologiques diverses: antioxydant, antidiabétique, anticancéreux, anti-inflammatoire, cardioprotecteur, ostéoprotecteur, neuroprotecteur, anti-âge, antihypertenseur, antiseptique, protecteur cérébrovasculaire, réducteur de cholestérol, hépatoprotecteur, antifongique, antibactérien [29].

II-3-1-1-Classification des polyphénols:

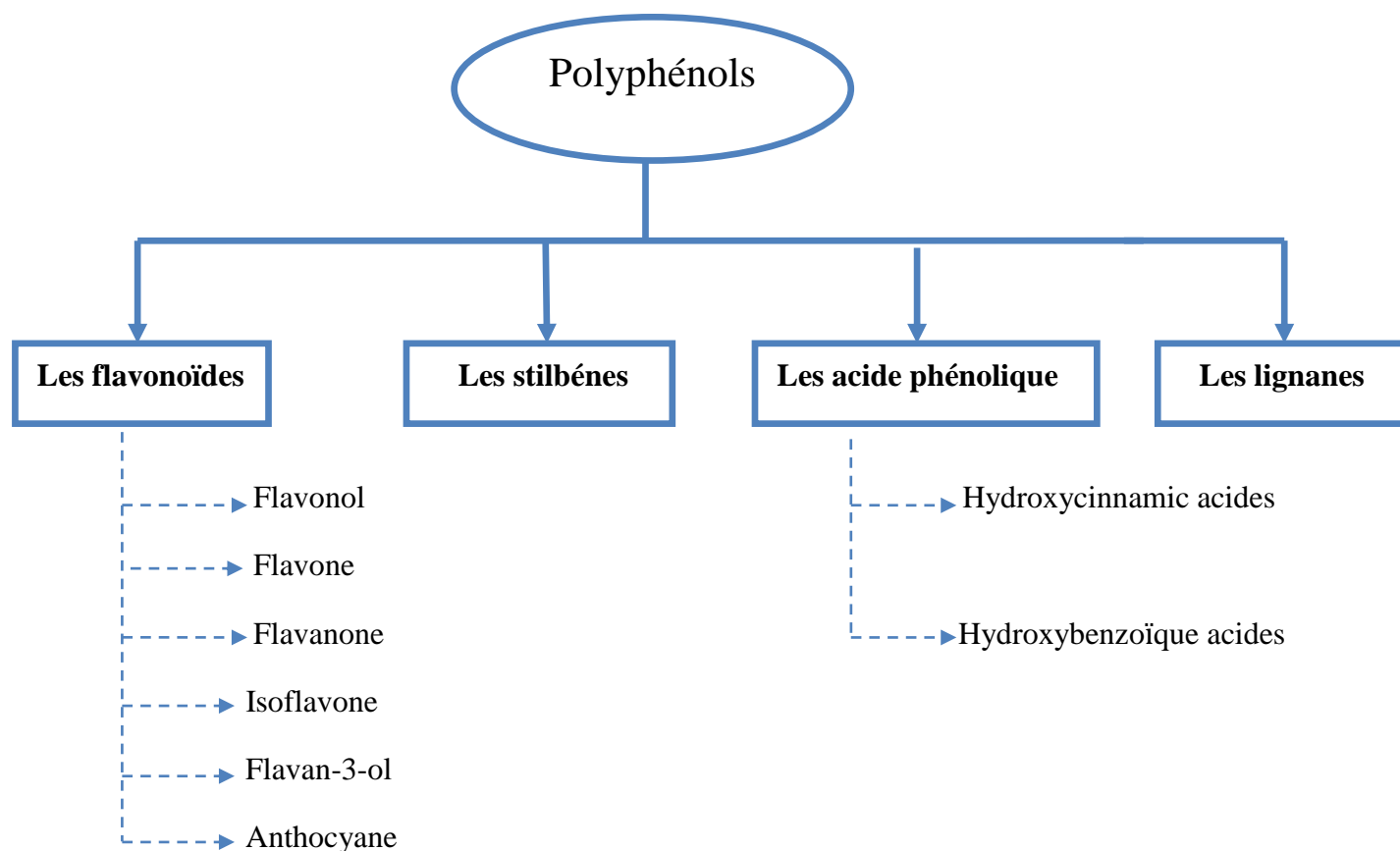


Figure (II-2): Les principales classe des polyphénols [28].

Les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections [28].

A-les stilbènes:

Les stilbènes sont naturellement présents dans une grande variété de produits alimentaires comme les raisins, les baies, les cacahuètes, le vin rouge, La structure de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatique joints par un pont d'éthylène.

Deux isomères optiques existent naturellement: *cis* et *trans* avec des propriétés chimiques et biologiques différentes [31].

Les stilbènes sont des phytoalexines synthétisées par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes : champignons, bactéries et virus [32]. Ils possèdent un large spectre d'effets thérapeutiques : antioxydant, anticancéreux, cardioprotecteur et neuroprotecteur [33].

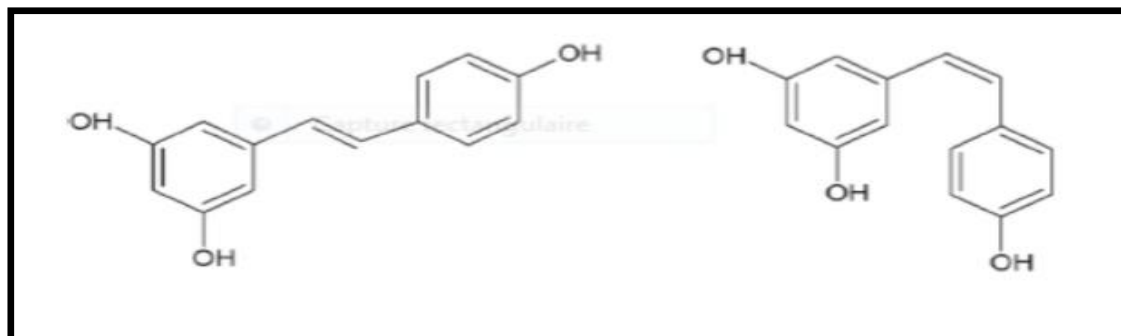


Figure (II-3): Structure de base des stilbènes (trans ou cis) [30].

B- Les acide phénolique :

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique et ils sont représentés par deux sous-classe [34]:

- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.
- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique.

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxy cinnamiques (C6-C3) et les acides hydroxybenzoïques (C6-C1):

Acides hydroxycinnamiques:

R1=R3=H, R2=OH Acide p-coumarique

R1= R2=OH, R3 =H Acide caféique

R1= OCH3, R2=OH, R3=H Acide férulique

Acides hydroxy benzoïques:

R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH Acide vanillique

R1= H, R2=R3=R4 =OH Acide gallique

R1=OH, R2=R3=R4=H Acide salicylique

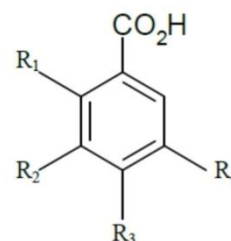
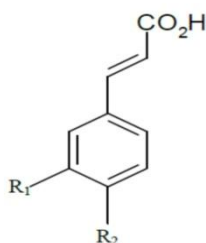


Figure (II-4): Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamique [32].

C- Les lignanes:

Les lignanes forment la classe des composés phénoliques les plus répandus dans le règne végétal. Ils ont une structure dimérique lors de l'oxydation de deux unités de phényl propanoïde C6-C3 [37].

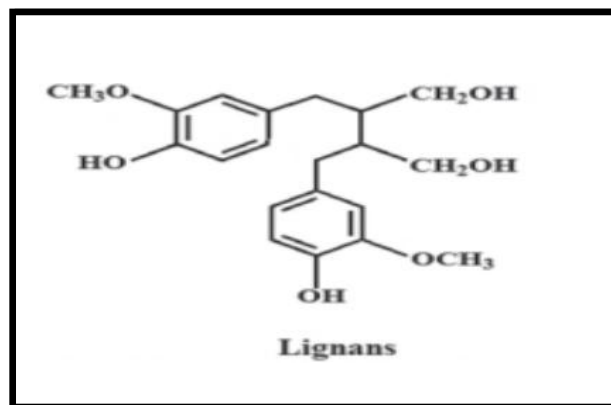


Figure (II-5): Structure des lignanes [33].

Les lignanes sont associés à la fibre végétale de nombreux aliments comme les céréales, les noix, les graines, les légumes et les boissons (le thé, le café ou le vin) .

II-3-2-Les flavonoïdes :

II-3-2-1-Généralité et définition:

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénol, avec plus de 9000 composés différents [36], et distribués de manière générale, dans toutes les plantes médicinales.

Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (figure1). Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C.

Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont: les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (Tableau III) [37].

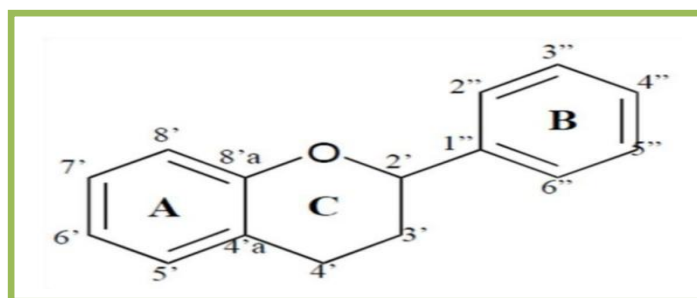


Figure (II-6): Squelette général des flavonoïdes

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

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

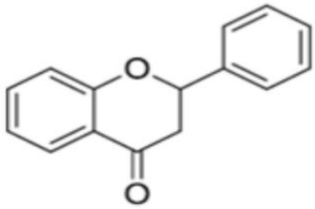
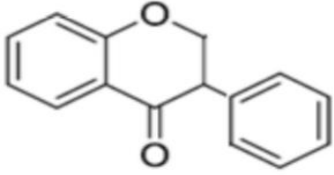
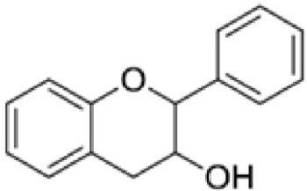
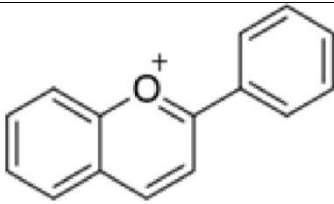
-Le degré d'hydroxylation des différents cycles.

-Le niveau de méthylation

-Le niveau de glycosylation, parce que ces composés sont fréquemment attachés à des sucres (glycosides), ce qui leur confère un caractère plus hydrosoluble [38].

Tableaux (II-1): Différentes classes Structure des squelettes des principaux groupes flavonoïdes [37].

Le nom	Structure des différentes classes de flavonoïdes	Exemples	Substitutions					
			5	6	7	3'	4'	5'
Flavonols		Kaempférol	OH	H	OH	H	OH	H
		Quercétine	OH	H	OH	OH	OH	H
		Myricétine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavone		Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
		Chrysin	OH	H	OH	H	H	H
		Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H

Flavanone		Hespéridine	OH H OH OH OMe H
		Naringénine	OH H OH H OH H
Isoflavone		Daidézéine	OH H OH OH OH H
		Génistéine	OH H OH OH OH OH
Flavan-3-ol		Catéchine	H H OH H OH H
		Gallocatéchine	OH H OH H OH H
Anthocyane		Pélargonidine	OH H OH H OH H
		Cyanidine	OH H OH OH OH H
		Delphinidine	OH H OH OH OH OH

II-3-2-3- La chimie des flavonoïdes :

A- La biosynthèse des flavonoïdes :

La biosynthèse des flavonoïdes fait intervenir des voies communes: la voie shikimique grâce à la **phényl alanine ammonialyase (PAL)** [39], et la voie acétate grâce à la **chalcone synthase (CHS)** [40]. Le (PLA) permet la synthèse d'acide **p-coumarique** et d'**acide cinnamique**.

L'élaboration des composés phénoliques réside dans la condensation de trois unités de **malonyl-CoA** avec l'acide **para-coumarique**, conduisant aux deux noyaux aromatiques A et B relié par l'hétérocycle C.

Ces condensations ont catalysées par la **chalcone** (C15) synthèse (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit a un précurseur (Figure 4). La **chalcone** néoformée donne une flavanone, une transformation catalysée par une chalcone-isomérase (**CHI**) [41].

Le flavanone est au centre de la synthèse des différentes classes de flavonoïde par action enzymatique: la flavone-synthétases (FSI) introduit une double liaison en 2,3 pour donner une flavone; la flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une flavanone pour donner un dihydroflavonol qui est transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS). Ces molécules peuvent subir deux types de substitutions : les O-substitution et les C-substitutions qui sont soit de nature hydroxylique, méthoxylique ou osidique. La figure suivant expliquer la voie biosynthétique des flavonoïde

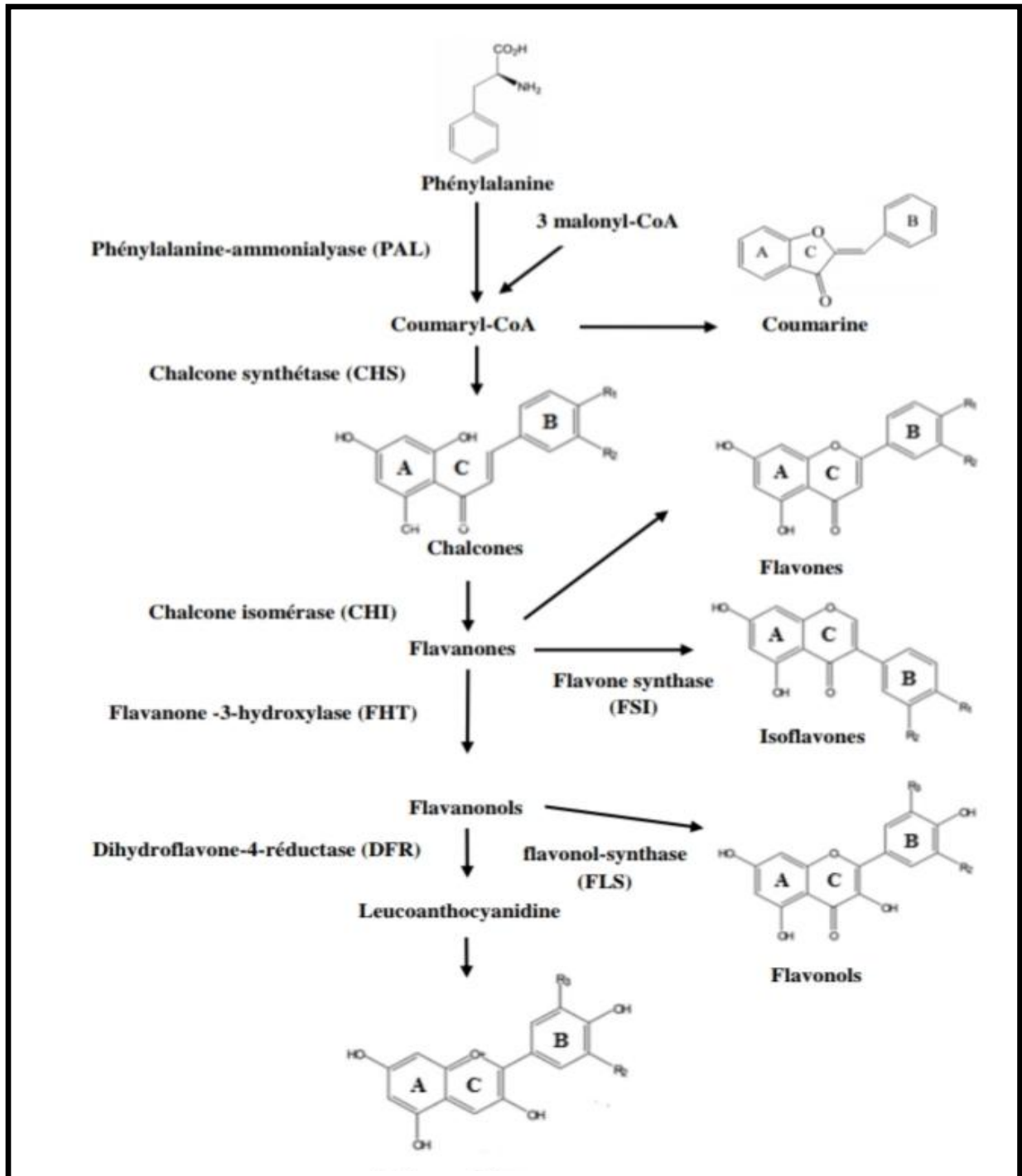


Figure (II-7): Les principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes

B- Propriétés Physico-chimiques des flavonoïdes :**La solubilité:**

Selon des différentes interactions peuvent se développer en présence d'un solvant [42]:

- Des interactions hydrophobes au niveau des cycles aromatiques (A et B) et des substituants carbonés aliphatiques en présence des solvants apolaires
- Des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle)
- Des liaisons hydrogène entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde
- Des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH [43].

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile de prédire la solubilité d'un composé dans un solvant. Toute fois, les flavonoïdes non glycosylés sont en général solubles dans des solvants apolaires ou de faibles polarités tels que l'éther éthylique, les solvants halogénés, l'hexane. En revanche, les hétérosides sont plutôt solubles dans des solvants polaires (acétone, alcools) et dans l'eau.

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

L'extraction des flavonoïdes se fait selon le protocole préconisé par Lebreton (1967) modifié par Boutard (1962), Gonnet (1973) et Jay (1975). Dont les étapes essentielles sont:

Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol de pourcentage 1/1 ou 3/7) [44].

Extraction successives de type **liquide-liquide** par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont :

- ❖ L'éther de pétrole pour éliminer: (les graisses, les turbines et la chlorophylle).
- ❖ Le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés.
- ❖ L'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés.
- ❖ En dernier le n-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosyles et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.

❖ Les extraits obtenus sont ensuite **évaporés** à sec .

Après concentration et élimination d'alcool le plus possible. L'extrait est traité avec de l'éther de pétrole, Chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol [46].

II-3-2-5-Détection des flavonoïdes :

A-Tests préliminaires des flavonoïdes :

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

Ajouter la solution d'ammoniaque à (3M) : donne un couleur jaune [47].

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

-H₂SO₄ concentré : donne également la couleur jaune ou orange.

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

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

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

-DéTECTEUR DE **Neu**: donne une couleur jaune ou orange avec spécial les flavonoles et flavones [45].

Le tableau suivant montre les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH₃.

Tableau (II-2): Les couleurs de certains flavonoïdes en présence et en l'absence de vapeurs de NH₃:

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

II-3-2-6- Séparation et purification:

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur la technique de chromatographie, Il y a plusieurs techniques chromatographiques telles que:

- Chromatographie liquide sur colonne.
- Chromatographie sur papier.
- Chromatographie sur couche mince.
- Chromatographie haute performance [47].

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels [48].

Les systèmes de solvants chromatographiques de bases sont :

- 1- AcOH : acide acétique à différentes concentrations.
- 2- [4/ 1 / 5]: n-butanol / Acide acétique / eau.
- 3- [4/ 1 / 5]: méthanol / Acide acétique / eau.
- 4- [3/ 1 / 1]: tertiobutanol / Acide acétique / eau.

Tableau (II-3): les systèmes les plus utilisés pour la séparation des flavonoïdes par CCM

Flavonoïde	Système de séparation
Tol-Hex-MEC-MeOH ; (60:30:10:5) Tol-MEC-MeOH ; (4:3:3) Tol-Ep-MEC-MeOH ;(60:26:10:10)	Aglycones méthoxylés
MeOH-AcOH-H ₂ O ; (18:1:1) H ₂ O-MeOH-MEC-Acac ;(13:3:3:1) H ₂ O-EtOH-n-BuOH-AcOH; (50:25:20:2)	Aglycones polyhydroxylés et glycosylés

II-3-2-7- Caractérisation structurale :

Les méthodes d'analyse chromatographique doivent être associées à des méthodes physicochimiques et de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse pour déterminer la structure des flavonoïdes [49].

A- Facteur de retardement chromatographique :

Les valeurs des R_f effectués sur des systèmes chromatographiques spécifiques ou conventionnels peuvent si elles sont bien utilisées et peu être déterminée pour savoir si le composé aglyconique savoir si le composé mono-sucre ou binaire ou tri-sucre [47,49].

Ce dernier point permet effectivement de classer les composés à analyser selon la nature des substituant présents sur ces squelettes La valeur de R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

Le valeur de R_f entre 0 et 1 .

Tableau (II-4) : la relation entre R_f et la structure [50].

Structure flavonoïque	R_f
Augmentation des OH	Diminution de R_f dans un solvant lipophile
Glycosylation	R_f diminue dans un solvants organique et augmente dans un solvant aqueux.
Hydroxyles méthylés	R_f augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	R_f diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3-OH libre	R_f nul dans l'eau

B- Fluorescence sous lumière de Wood :

L'absorption des substances flavanoïques sous lumière de Wood donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique, l'absorbance des substances flavanoïques sous lumière de Wood à la longueur d'onde (365 nm) [51,52].

Tableau (II-5): Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavanoïques [50].

La fluorescence	Les structures possibles
Violette-noire	Flavones avec 5,6,7 ou 5,7,8 trihydroxyflavone Flavonol avec 3-OR Chalcones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavonol Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

C- La spectrophotométrie UV-Visible :

Les techniques de spectrophotométrie UV visible c'est une méthode simple et rapide qui fournit des informations sur la nature chimique et le plus utilisée pour l'identification des structures flavanoïques. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques.

Chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules; Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanolique) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [53].

D-Chromatographique et la purification sur la plaque CCM préparatoire:

La Chromatographie sur la plaque de la couche mince (CCM) repose principalement sur les phénomènes d'adsorption [47].

La phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur la couche mince sont : La cuve chromatographique, la phase stationnaire (gel de silice, cellulose ou le polyamide), l'échantillon et l'éluant[53].

❖ Spectre méthanolique ou (éthanolique):

Le spectre d'absorption UV pris dans le milieu méthanolique MeOH se compose de deux bandes d'absorption [54]:

Bande I :(300 et 400 nm), elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau (B) [26].

Elle donne donc des renseignements sur la variation structurale du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II : (240 et 280 nm), elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [26,55].

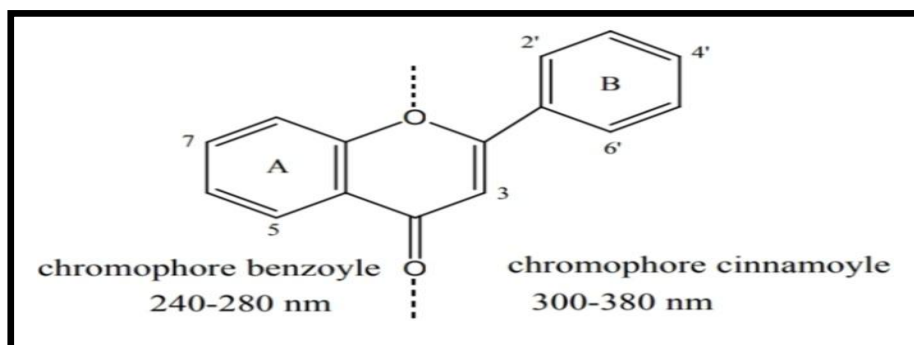


Figure (II-8): Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonoïque

Tableaux (II-6)- La relation entre d'absorption UV et le type des flavonoïdes

Type de composé flavonoïque	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidin	465-560	270-280

*Le spectre méthanolique d'un composé flavonoïque peut être modifié par l'addition de certains réactifs tels que: NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl qui donnent des informations sur la structure du composé à travers leurs réactions avec le groupement hydroxyle libre sur le squelette flavonoïde.

❖ Addition des réactifs (série spectrale UV):

Les spectres UV des composés flavonoïques purifiés enregistrés dans le méthanol permettent de déterminer la classe de flavonoïdes à laquelle ils appartiennent. Ces spectres peuvent être modifiés en présence de réactifs tels que la soude, le chlorure d'aluminium, l'acétate de sodium et l'acide borique. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonoïque [55,47].

En général, la procédure d'enregistrement des spectres avec addition des réactifs se fait comme suit :

✓ **Première série spectrale:**

- Enregistrement du spectre du composé flavonoïque purifié dans le méthanol. La densité de la solution est voisine de 0.5.
- Addition de 3 gouttes de solution aqueuse de soude (NaOH 0.5 N) sont ajoutées à la solution précédente. Enregistrement immédiat du spectre en présence de soude, puis après 5 minutes.

✓ **Deuxième séries spectrale**

- Enregistrement du spectre du composé flavonoïque dans le méthanol.
- Addition de 5 gouttes d'une solution méthanolique à 1% de chlorure d'aluminium (AlCl₃) et enregistrement du spectre en présence de AlCl₃.
- Addition à la cuve précédente de 3 à 5 gouttes de HCl (2N). puis enregistrement du spectre AlCl₃/HCl.

✓ **Troisième série spectrale**

- Enregistrement du spectre du composé flavonoïque dans le méthanol.
- Quelques grains d'acétate de sodium NaOAc sont ajoutés à la solution précédente et après dissolution, le spectre en présence de NaOAc est mesuré.
- Le spectre NaOAc/H₃BO₃, est enregistré après addition de 5 gouttes à 5% de H₃BO₃ à la cuve contenant NaOAc.

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

Tableaux (II-7): Les principaux déplacements des bandes I et II .

Spectre UV	Bande I	Bande II	Types de flavonoïdes	Références
MeOH	320-350 352-385 300-330 348-390 380-430	250-270 250-280 245-275 230-270 230-270	Flavones Flavonols Flavanones Isoflavones, Chalcone Aurones	[45]
Spectre UV en présence de réactifs	Bande II	Bande I	Substitutions	Références
NaOH/ MeOH		+40 a 60nm +50 a 60nm	OH en 4' OH en 3' et 4'OR	[53]
	Bande III entre le Bande I et II		OH en 7	[54]
NaOAc/ MeOH	+5 a 20nm		OH en 7	[54]
NaOAc + H ₃ BO ₃ / MeOH		+12 a 36 nm +5a 10nm	Ortho di-OH 3',4'	[53]
AlCl ₃ / MeOH		+60 nm +35 a 55nm	OH en 3 OH en 5	[53]
AlCl ₃ +HCl/ MeOH		-30 a -40 -20a -25	Ortho di OH sur le noyau B Ortho di OH sur le noyau A(en plus ortho di OH sur le noyau B).	[51]
		+35 a 55 +17 a 20 +50 a 60	5-OH 5-OH 3-OH ou 3-OH et 5- OH	[53]

II-3-2-8-Les techniques d'identification Structurale:

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques:

La spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone.

A- La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN):

La résonance magnétique nucléaire ou **RMN** est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques, Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont: **le proton(H¹), le carbone(C¹³), le phosphore (P³¹), et l'azote (N¹⁵), le sodium (Na²³), le potassium (K³⁹),le fluor(F¹⁹) [57].**

B-RMN monodimensionnelle (RMN – 1D) :

Les spectres de résonance magnétique (**RMN**), qui sont des **RMN H₁** et **RMNC₁₃**, ont été largement utilisés Etude et distinction des sectes flavonoïdiennes.

C- RMN H₁ :

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton [**55,53**].

Le spectre RMNH¹ des composés flavonoïques donne des informations sur l'environnement des différents protons flavonoïques qui résonnent généralement entre 6 et 8 PPM et il permet de connaître [**56**]:

- La position et le nombre des protons portés par le flavonoïde.
- Le nombre de substituant méthoxyles portés par le squelette flavonoïque.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

❖ Les déplacements chimique des différents protons du cycle A et B du squelette flavonoïque [58,59].

Le tableau suivant montre le déplacement chimique des différents protons du cycle A et B du squelette flavonoïque.

Tableau (II-8): Les déplacements chimique des protons du cycle (A)

Type de flavonoïde	H-5		H-6		H-8	
	δ .ppm (j;Hz)		δ .ppm (j;Hz)		δ .ppm (j;Hz)	
5,7-OH	/		6,0-6,2	d:2,5	6,3-6,5	d:2,5
5-OH;7-OH (R=Glu)	/		5,9-6,1	d:2,5	6,1-6,4	d:2,5
5,6,7-OR (R=H, Glu)	/		/		6,3s	
5,7,8-OR (R=H, Glu)	/		6,3s		/	
7-OR (R=H, Glu)	8	d:9	6,7-7,1	d:2,5-9	6,7-7	d:2,5

Tableau(II-9): Les déplacements chimique des protons du cycle (B).

Type de Flavonoïde	H3', H5'		H2', H6'	
	δ .ppm (j;Hz)		δ .ppm (j;Hz)	
Flavone (4'-OR)	6,5-7,1	(d:8,5)	7,7-7,9	(d:8,5)
Flavonol (4'-OR)	6,5-7,1	(d:8,5)	7,9-8,1	(d:8,5)

Type de Flavonoïde	H-2'		H-6'	
	δ .ppm (j;Hz)		δ .ppm (j;Hz)	
Flavone (3',4'-OH; 3'-OMe; 4'-OH; 3'-OH; 4'-OMe)	7,2-7,3	(d:2,5)	7,3-7,5	(d:2,5-8,5)
Flavonol (3',4'-OH; 2'-OH; 4'-OMe)	7,5-7,7	(d:2,5)	7,6-7,9	(d:2,5-8,5)
Flavonol (3',4'-OH ; 3'-OH; 4'-OMe)	7,5-7,7	(d:2,5)	7,6-7,9	(d:2,5-8,5)

❖ Les déplacements chimique de Proton du noyau C:

Le proton H₃ des flavone donne un singulier entre 6.2 et 6.4 ppm.

❖ **Les déplacements chimique du Protons méthoxyles:**

Un ou plusieurs méthoxyles donnent des singuliers entre 3.8 et 4.5 ppm.

❖ **Les déplacements chimique du Protons de sucres :**

Le déplacement chimique du proton anomériques H^{1''} des sucres est lié à la position et la nature de la liaison entre le sucre et l'aglycone qui peut exister en deux genres : **O-glycosyl** ou **Les hétérosides C-glycosyl** [25].

Le tableau suivant donne les valeurs du déplacement des protons anomériques des quelques glycosides :

Tableau (II-10): Les valeurs du déplacement chimique de quelques protons anomérique des sucres dans le DMSO.

Nature de sucre	H-1''(δ-ppm)
3-O-β-D-Glucoside	5,25-5,56
3-O-β-D-Galactoside	5,60
3-O-β-D-Glucuronide	5,48
6-C-β-D-Rhamnoside	4,85-5,26

La valeur de la constante de couplage entre les protons H-1'' et H-2'' des glycosides monosaccarides sert à identifier la nature de la liaison α ou β entre le sucre et l'aglycone.

Par exemple pour le sucre glycose qui forme une liaison β, le H-1'' donne un doublet avec une constante de couplage J=7Hz due à un couplage diaxial avec le H-2''.

II-3-2-9-RMN ¹³C :

Elle donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telle que : [47,50].

Le nombre total des atomes de carbone du composé flavonoïque ainsi que leur environnement.

La connaissance du type des liaisons –C ou –O des sucres.

Le tableau suivant donne les plus importants déplacements de quelques atomes de carbone [61].

Tableau (II-11): Les déplacements chimiques de quelques carbones.

Nature de carbone	Déplacement chimique (ppm)
C-CH ₃ Aromatique	7-22
Flavone (C-3)	90-135
Flavone (C-2)	155-168
Flavonol (C-3)	135-144
Flavonol(C-2)	136-158

II-3-2-10-RMN bidimensionnelle (RMN – 2D) :

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection [60,61].

Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [62].

COSY(1H – 1H): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

NOESY (1H – 1H) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

HSQC (1JH-C) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

HMBC (2JH-C, 3JH-C) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance 2JHC, 3JH-C, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

Tableau (II-12): Les techniques RMN bidimensionnelles les plus importantes utilisées dans la détermination structurale des flavonoïdes de tous les types.

Corrélation homo-nucléaires		Corrélation hétéro-nucléaires	
COSY(1H-1H)	NOESY(1H-1H)	HSQC(1J _{H-C})	HMBC(2J _{H-C} ,3J _{H-C})

II-3-2-11-Spectrométrie de masse:

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage [60].

Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse. Celles généralement utilisées sont énumérées ci-dessous:

❖ Pour les flavonoïdes glycolyses:

1- Spectrométrie de masse à impact électronique (IE) :

C'est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée, le principe de cette technique consiste à volatiliser la molécule par chauffage sous vide et à bombarder cette vapeur [61,62].

2- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB):

Cette technique permet de connaître la nature des sucres, des molécules hétérosidiques polaires peu volatiles [62,64].

3- Spectrométrie de masse electrospray (E.S.I) :

C'est une technique d'ionisation douce, plus récente que la FAB. L'ionisation par ES dans le cas des flavonoïdes permet d'accéder à la masse moléculaire des molécules peu volatiles et à structure fragile comme : **O-glycoside** [62,64].

4-Technologie d'ionisation chimique (CI) & La technique d'ionisation chimique sous pression (APCI) : le même principe car les deux reposent sur des réactions ion-molécule [60,64].

II-3-2-12-Couplage des techniques chromatographiques avec des techniques spectroscopiques:

Le couplage **HPLC-MS**, Le couplage **HPLC-UV**, Le Couplage **HPLC-GC-MS**, Le couplage **CPG-SM**, Le couplage **CPG-IR**:

Toutes ces technologies sont caractérisées par la vitesse, la précision et la faible consommation du produit.

A- Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes :

La lumière [65,66], le pH [66, 67], la température [68, 69], la nature du solvant [65, 70], la présence d'enzyme [71], d'ion métallique [66, 72] et d'oxydant [70] ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des flavonoïdes. La stabilité des flavonoïdes est affectée par leur structure et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). Ainsi, l'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont donc moins réactifs.

II-3-2-13-Le rôle des flavonoïdes physiologiques:

Comme cela a été démontré par de nombreux travaux, les flavonoïdes sont des molécules de défense contre les organismes pathogènes, leurs propriétés ont été exploitées pour leur un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes.

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

Ils sont notamment : antiallergiques, anti-inflammatoires, antihypertenseurs, anti-influenzas, antifongiques, antivirales, antiulcéreux [64,71], anti-radicalaires [71], et on leur reconnaît également une activité anti-malaria [69].

les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [67].

A- Les flavonoïdes comme antioxydants :

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relations structure-activités dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que les activités des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydant [72]. optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs [73]. et sont présentés dans la **figures VIII**.

* La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène [74].

* Une double liaison entre les carbones C2 et C3, conjuguée à la fonction carbonyle en C4 permet une bonne stabilisation du radical phénoxy par délocalisation électronique [76].

* La présence de groupement hydroxyle en position 3 La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante [75].

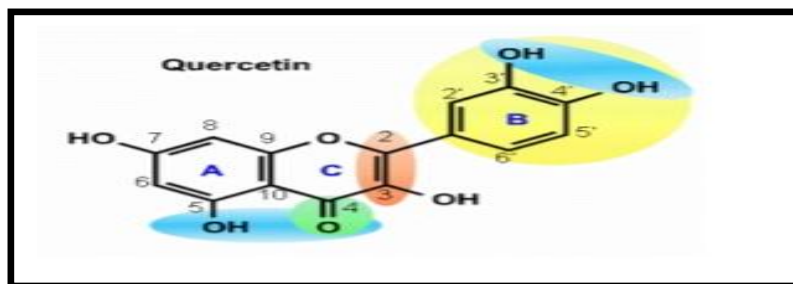


Figure (II-9): Représentation des éléments structuraux des flavonoïdes importants pour la neutralisation des radicaux.

B-Distribution et localisation des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, oranges, pamplemousses, et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, brocolis, tomates et sarrasin [77].

On en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [78,79].

II-3-3-Les alcaloïdes :

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIXème. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910.

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [78,80].

Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structure [81]. Ci-dessous se trouvent représentées les molécules d'alcaloïdes les plus courantes.

II-3-3-1- Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes [82] :

- Les alcaloïdes sont des composés de masse moléculaire variant 100 à 900.
- Leur saveur est amère.
- Les alcaloïdes ont un caractère basique, leur basicité dépend de la disponibilité du doublet de l'azote.
- Les alcaloïdes non oxygénés et de faible masse moléculaire sont des liquides entraînés à la vapeur d'eau à forte odeur.
- Les alcaloïdes oxygénés et de masse moléculaire élevée sont généralement des solides cristallins.

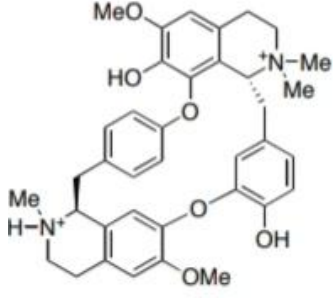
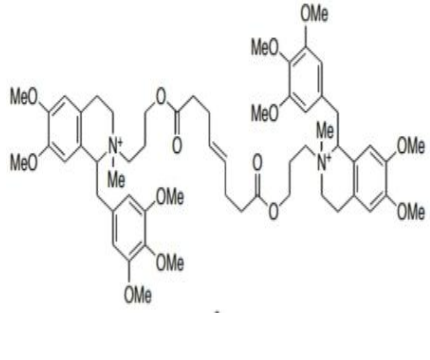

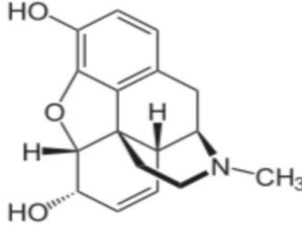

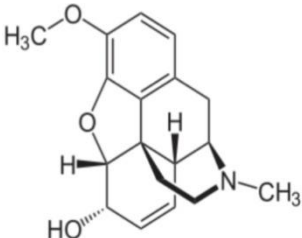
II-3-3-2- La Solubilité:


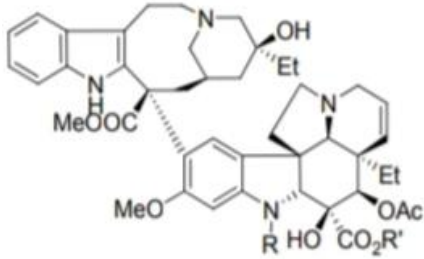
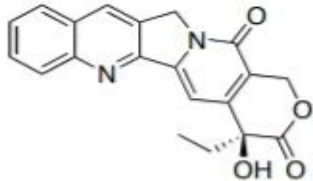

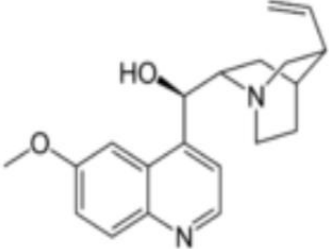
- Les alcaloïdes sont des composés à caractères basiques; ils forment des sels avec les acides (organiques et minéraux).
- Leur solubilité varie en fonction du pH.

II-3-3-3-Utilisations des alcaloïdes par l'homme :

Les alcaloïdes sont utilisés par les hommes depuis de nombreuses années, sous forme d'extraits naturels, pour leurs propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes. Les substrats naturels desquels sont isolés ces composés sont encore utilisés dans certaines tribus pour se soigner ou chasser [83]. sont aujourd'hui utilisés dans tous les domaines de la santé dont voici quelques exemples.

Tableau (II-13) : Les alcaloïdes et les indications thérapeutique.

Le nom	Structure chimique	Indication thérapeutique
(+)-tubocurarine		est un relaxant des muscles striés [84]. utilisés en milieu hospitalier comme relaxant musculaire, permettant d'éviter l'utilisation systématique d'anesthésies générales [84,85].
le mivacurium		est toujours une des molécules les plus efficaces pour la suppression de la douleur [87].
La morphine [86].  <i>Papaver somniferum</i> (<i>Papaveracea</i>)		est toujours une des molécules les plus efficaces pour la suppression de la douleur [87].
codéine10 [87].  <i>Papaver somniferum</i>		sous forme d'un latex communément appelé opium. pour ses propriétés analgésiques [83], narcotiques et pour le traitement de la toux.

<p>La vinblastine La Vincristine</p>  <p><i>Catharanthus roseus</i> [88].</p>	 <p>R=Me ,R'=Me (la vinblastine) R=CHO , R'=Me (la vincristine) La vincristine active que la vinblastine [84].</p>	<p>les deux composés montrent des activités anticancéreuses distinctes.</p> <p>Utilisés actuellement dans le traitement De cancer du sein ou du poumon mais aussi pour les lymphomes [84].</p>
<p>La camptothécine</p>		<p>Utilisé dans le traitement de cancers, notamment ceux des ovaires et du colon [84].</p>
<p>la quinine</p>  <p><i>Qinquina sp</i></p>		<p>pour le traitement du paludisme.</p>



CHAPITRE III
MATÉRIELS ET
MÉTHODES

III-1-L'étude phytochimique de la plante *Salsola vermiculata*:

III-1-1-Récolte du matériel végétale :

S. vermiculata a été recueillies en octobre 2018 dans la région de Biskra (Sud-est de l'Algérie). Il a été séché à l'ombre pendant plusieurs semaines (juste la partie arienne) et gardé à l'abri de la lumière et de l'humidité. La plante séchée a été coupée en petits morceaux.



III-1-2-L'extraction :

Le processus d'extraction a été réalisé selon la méthode utilisée dans la plupart des références visant à extraire les flavonoïdes et les polyphénols. à l'étape de la macération, nous avons utilisé le système (eau /éthanol) (30/70); Le choix des solvants était selon la disponibilité, le moins chère et moins de toxicité. Les étapes de L'extraction sont montrées dans le protocole suivant :

1-Macération: plante sèche (1836.8014g): Tremper dans un système (ethanol/eau) 70/30 (chaque fois de 24h a 72h) .**2- filtration.**

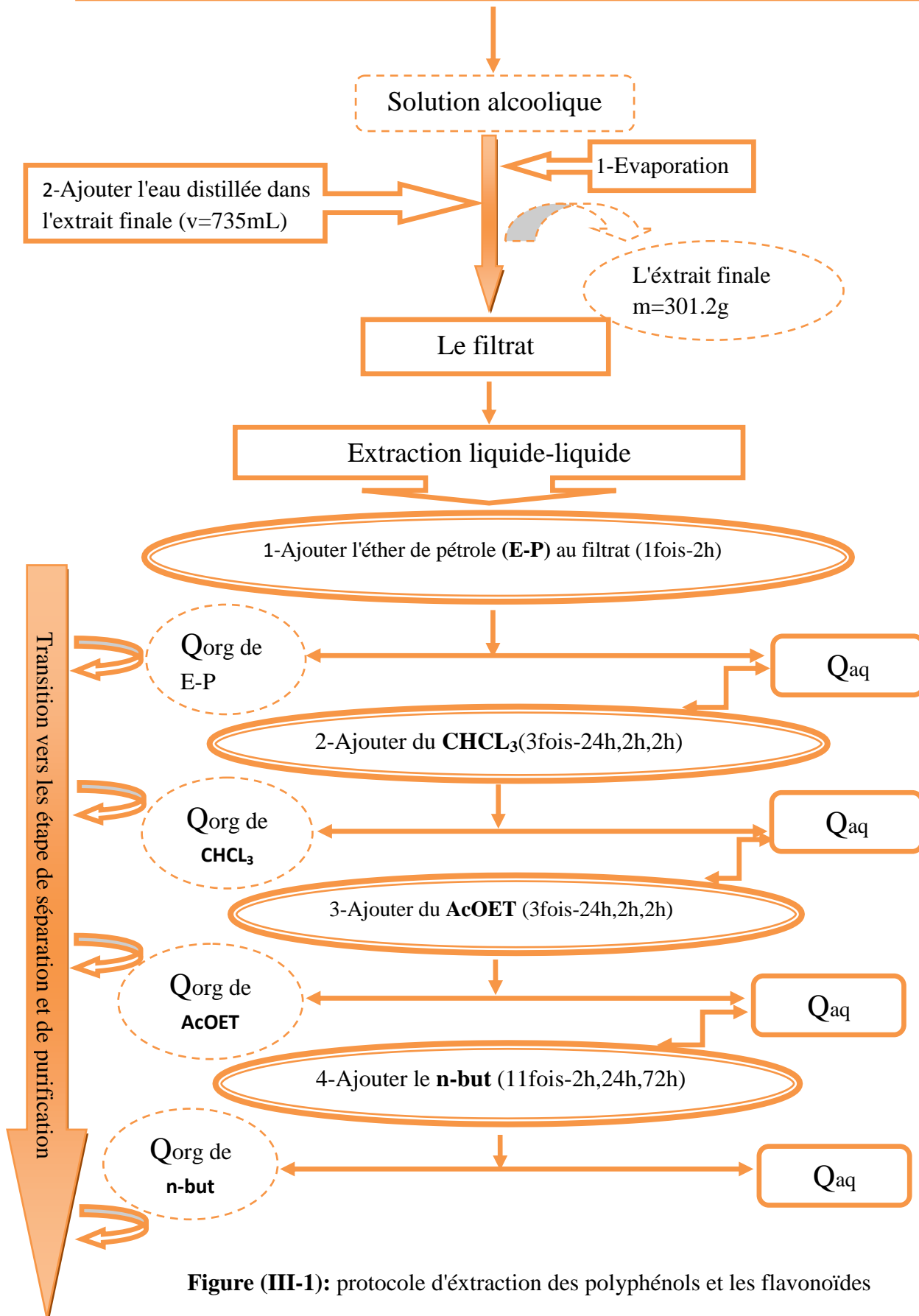


Figure (III-1): protocole d'extraction des polyphénols et les flavonoïdes

III-1-3- Etude quantitative:

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur taux en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux, en tanins condensés et l'évaluation de l'activité antioxydant et antibactérienne.

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


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

R (%): le rendement en (%).

m extrait: la masse de l'extrait après évaporation du solvant en (g).

m₀: la masse sèche de l'échantillon végétal en (g).

Tableau (III-1): Les poids des phases et leurs rendement d'extraction.

La phase	Q (E-p)	Q (AcOET)	Q (aq)
			
Le poids(g)	0.5	2.576	28.6387
Le rendement%	0.0272	0.14024	1.55916

III-1-4- Les tests préliminaires phytochimiques :

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

Les premiers tests pour détecter les familles chimiques existantes sont très importants:

Grâce à ces rapports, nous pouvons voir les différents niveaux métaboliques dans la plante étudiée en ajoutant des réactifs ou des processus sous lumière ultraviolette.

Nous avons préparé huit tubes contenant chacun **1ml** d'extrait brut d'éthanol. Ensuite, nous avons ajouté le réactif approprié pour chaque famille [89].

Tous les tests ont été résumés dans le tableau suivant:

Tableau (III-2) : La résumer des tests préliminaires des familles chimiques.

La famille	La méthode de detection	La couleur
Alcaloïdes	Ajouter des gouttes de réactif de Dragedrouf Wagner	la couleur Brun ou précipité blanc
Acide amine	Ajouter des gouttes acétate de plomb (10%)	la couleur rose ou rouge claire
Coumarines	Ajouter NaOH 10%	la couleur Jaune
Carbohydrates	Ajouter le réactif de Fehling (A+B)	la couleur rouge-aguri
Flavonoïdes	Ajouter le HCl concentré +copeau de Mg	la couleur Jaune
Phénol	Ajouter des gouttes FeCl₃ (1%)	couleur Grise a tendance a noir
Proteine	Ajouter 5goutte de NaOH (10%) +5goutte CuSO₄(1%)	la couleur Violet ou rose
	3ml de l'extrait, et ajouter 3 goutte de solution de acétate de Pb (5%) (c°) 10 min.	la couleur Violet ou bleu
Saponines	Ajouter H₂O + Agitation vigoureusement	une hauteur de moss persistante
Stéroïde	Ajouter goutte de CHCl₃ +goutte de H₂SO₄	La couleur Rouge
Tanins	Ajouter HCl (c°)	Vert-noir ou bleu-noir
Terpenoïdes	5 ml d'extrait brute est ajouté à 2ml de CHCl₃ 3ml d'acide sulfurique concentré.	Deux phase et couleur marron

III-1-5-Séparation et pétrification:

La Chromatographie sur Couche Mince (**CCM**) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption avec comme phase stationnaire une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé Une fois le développement du

chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV(longueurs d'ondes $\lambda = 254 \text{ nm}$ et 365 nm).

III-1-5-1- Préparation de la plaque CCM :

A- La phase stationnaire :

C'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support d'aluminium (silica-gel, **Merck, 60 GF 254**), ou un support en verre de dimension (20cm×20cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5-0.2 mm.

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

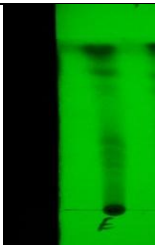
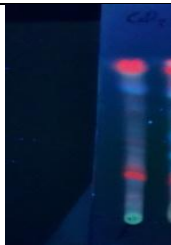
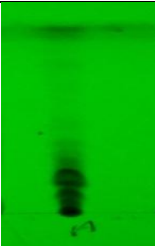
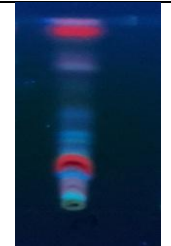
La phase mobile : c'est un mélange des solvants.

B- Les échantillons : Les échantillons sont : éther de pétrole, acétates d'éthyle, qui sont solubilisés dans le méthanol puis déposés en petit spots sous forme de points sur l'absorbant (gel de silice) par pipette pasteur (avec quelques modification à la tête par flamme). La plaque est séchée à température ambiante puis examinée par l'UV à (longueurs d'ondes $\lambda=256\text{nm}$ et $\lambda=365\text{nm}$) et le révélateur (l'ammoniac).

C- Les analyses préliminaires :

Nous notons à partir de l'analyse des résultats préliminaires que la phase de l'éther de pétrole et la phase acétate sont riches en produits, les photos montrent les résultats de séparation initiale dans le systèmes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9,5-0,5) sous la lampe l'UV

Le Tableau (III-3): Les résultats de l'analyse initiale sur les plaques CCM

Les phases	La photo sous la lumière $\lambda=365$	La photo sous la lumière $\lambda=250$
La phase éther de pétrole		
La phase acétate		

III-1-6- La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

III-1-6-1-La phase stationnaire: C'est le support solide, qui est la colonne de gel de silice, elle est montée dans le moins polaire des solvants utilisés qui est le chloroforme dans notre cas.

III-1-6-2- La phase mobile: Représente le solvant d'éluion utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire.

Pour la préparation de la colonne, une quantité $m=30\text{g}$ de gel de silice a été mélangé avec 70ml de chloroforme dans un bécher, après ajouté dans une colonne a une hauteur de 30cm.

Après dissolution de la phase chloroformique dans le chloroforme, le mélange est additionné à une quantité de gel de silice, puis évaporé à sec ce qui conduit à l'obtention d'une poudre solide qu'est introduite délicatement dans la colonne puis fractionnée avec le gradient (chloroforme/méthanol) de polarité croissante, l'éluion doit être pour suite jusqu'au méthanol pur. A chaque fois des fractions de 100 ml sont collectés.

La fraction(14) collectée est soumise au contrôle chromatographique sur couche mince, puis révélées aux UV (254 et 365 nm); le système de ce fraction est de (7%).

L'utilisation d'un système de séparation de la fraction(14) **100% CHCl_3** dans une plaque de (7×20) dimension nous a donné le résultat suivant:

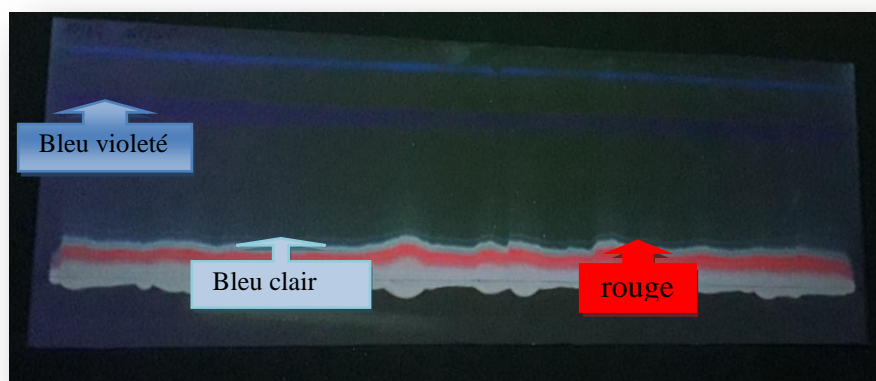


Figure (III-2): séparation de la fraction (F14)sous la lampe UV $\lambda=250\text{nm}$

Premièrement on a grattée la band bleu violeté puis dissolvez dans le méthanol, Ensuite filtrer avec coton et évaporé le méthanol pour la concentré, on obtenir la nouvelle fraction est (F14*).

pour confirmer la Fraction (F14*) est pur on utilise la séparation sur couche mince (CCM) dans les milieux suivant :

- 100% CH₃Cl
- ETp/MeOH 5/5
- CH₃Cl/Acétone 9/1
- Hexane/ CH₃Cl/AcOET 4/4/1
- CH₃Cl/ MeOH 9/1

III-2-Dosage des extraits

III-2-1- Dosage des polyphénols totaux

A- Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux:

La concentration en phénols totaux des extraits des différentes parties de la plante étudiée a été déterminée par la méthode de SINGLETON et ROSS [90]. en utilisant le réactif de **Folin-Ciocalteu**. Il est formé d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), qui absorbent fortement à une longueur d'onde de 760 nm.

La courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de **l'acide gallique** de concentration massique (0.25 g/l), les solution sont préparées avec des concentrations allant de (0.03g/l à 0.3g/l) dissous dans l'eau.

Mode opératoire :

On met 0.1ml de chaque solution dans des tubes à essai. Puis on ajoutés 0.5 ml du réactif de **Folin-Ciocalteu** à (10%). Après 5 minutes, nous ajoutons 2 ml (Na_2CO_3) à 20%. Ensuite.. Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à (760 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois .le résultat est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**).

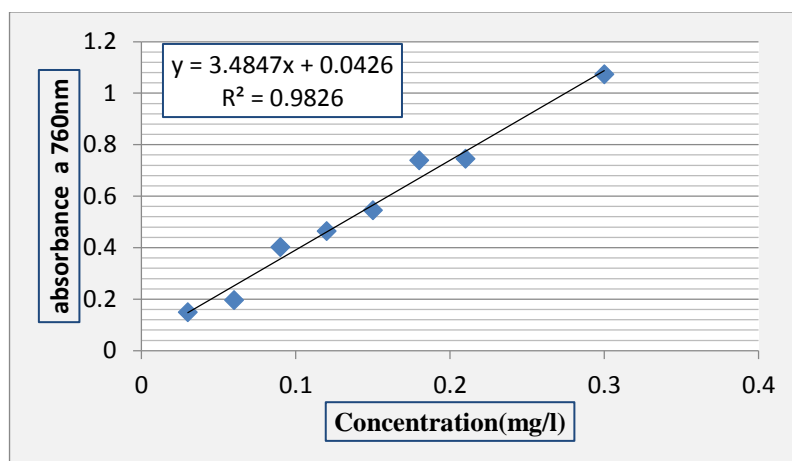


Figure (III-3): La courbe standard de l'acide gallique

III-2-2-Dosage des flavonoïdes:

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par une méthode basée sur la formation de complexe entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

La courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de la quercitrine de concentration massique 0.025g/L, des solutions sont préparées avec des concentrations allant de (0,003 g/L à 0.025 g/L) dissous dans l'éthanol.

Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à (430 nm).

Mode opératoire:

On mélange 1.5ml de chaque extrait avec 1.5ml trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2%). Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois, La concentration des flavonoïdes totaux (TF) est exprimée par (mg EQE/g) de matière sèche.

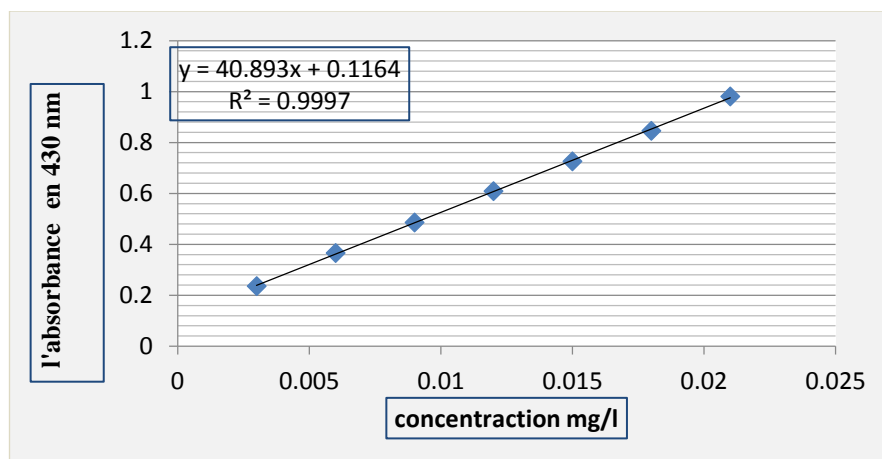


Figure (III-4): La courbe standard de la quercitrine

III-2-3- Dosage des tanins condensé

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de la catéchine de concentration massique 0.1 g/L, des solutions sont préparées avec des concentrations de (0.01 g/L à 0.1 g/L) dissous dans l'éthanol.

Mode opératoire:

On met 3ml de chaque extrait et 3ml **vanilline** (4%) est ajouté 1.5ml de **HCl** concentré.

Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. La concentration des tannins (TC) est exprimée par (mg EAC/g) de matière sèche.

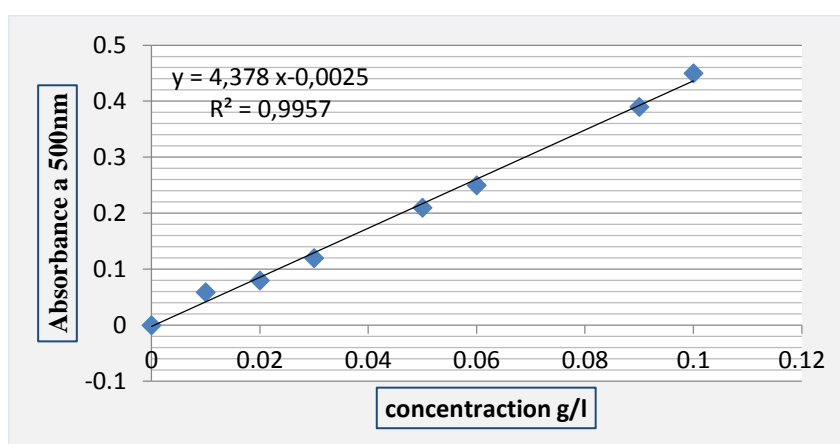


Figure (II-5): La courbe d'étalonnage de la catéchine

III-3- Étude de l'efficacité antioxydant des extraits

III-3-1-Activité antioxydant totale (TAC)

A-Définition la méthode de (TAC) :

Le test du PPM (**Phosphomolybdène**) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant [91].

B- Le Principe de TAC:

Cette méthode est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) en présence des composés antioxydants et donc la formation d'un complexe vert de phosphate/Mo à un pH acide.

Mode opératoire :

Un volume de **0.3 ml** de chaque extrait est mélangé avec **3 ml** de solution du réactif (**0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium**). Les tubes sont vissés et incubés dans un bain marie à **95°C** pendant **90 min**.

Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à **695 nm** contre le **blanc** qui contient **3 ml** de la solution du réactif et **0.3 ml** de l'éthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon [92]. Les expériences sont répétées en **3 fois**.

L'activité antioxydant est mesurée selon un niveau terme appelé **AEAC** (ascorbique acide équivalent antioxydant capacité). on définit **AEAC** comme la concentration molaire de la solution d'acide ascorbique qui possède un pouvoir réducteur équivalent a solution de concentration **1M** de l'antioxydant étudié.

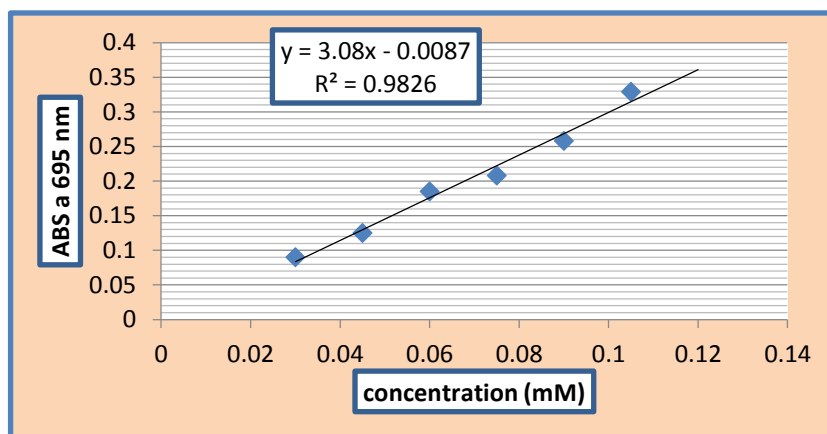





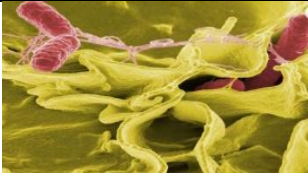

Figure (III-6): La courbe standard de phosphomolybdène

III-4- Activité antibactérienne :

III-4-1- Les souches bactériennes :

5 souches de bactéries référencées ont été obtenues de laboratoire du département de sciences biologiques d'université d'Ouargla.

Tableau (III-4): Colonies bactériennes étudié

Les souches bactérienne	Petit définition	Photo de la bactérie
Escherichia coli ATCC25922	Bacille aérobie et Gram- que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.	
Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	Bacille aérobie, Gram- , souvent responsable d'infection nosocomiales (germe ubiquitaire). c'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.	
Staphylococcus aureus H3300	Cocci à Gram+ ubiquitaire, commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste. Responsable d'infections alimentaires et sa résistance aux antibiotique est parfois un grande problème pour le traitement des patients.	
Salmonella typhimurum ATCC14028	Bactérie pathogène Gram- Présence d'antigènes somatiques (O) et flagellaire (H).	
Bacillus subtilis ATCC6633	Gram+ , aéro-anaérobie, ubiquitaire synthétisant deux types de toxines: une toxine thermostable et une toxine thermolabile. Responsable d'intoxications alimentaires opportunistes.	

III-4-2-Préparation des extraits :

Nous avons pris 0,1 g de chaque extrait dans 1 ml de DMSO, puis diluer chacun avec des concentrations spécifiques.

III-4-3-Stérilisation :

Avant de commencer le travail, la surface de travail a été nettoyée avec de l'eau javel, le travail est près d'un bec benzène. Nous avons préparé des disques de 5mm de diamètre de papier **whatman 3** qui a une bonne absorption des extraits, (un forceps + ces disques) sont stérilisent à **120°** pendant **20 min** dans autoclave.

III-4-4-Les étapes d'activité antibactérienne:

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

1^{er} étape: *Ensemencement* :

Les bactéries sont prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile de l'eau physiologique (10ml), Il est étalé sur la surface du milieu de manière zigzag 3 fois, en prenant soin de couvrir toute la surface avec des colonies bactériennes.

2^{ème} étape: *L'antibactérienne:*

Chaque disque est plongé dans les extraits. On laisse les disques séchés dans la température ambiante, avec un forceps stérile on dépose les disques dans les boîtes pétri. Puis Les boîtes Pétri sont placées dans une étuve pendant 24 heures à 37 °C.

3^{ème} étape: *Analyse des résultats* :

Plus la zone d'inhibition est grande, plus la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait étudié est grande. Chaque zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en **mm** [93].

III-4-5-Méthode de micro-dilution en milieu liquide :

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

Le but de cette technique est de déterminer la **CMI** de chaque extrait. Cette technique inhibant toute croissance visuelle avec une période de 18 à 24 heures sous température 37°C . Le CMI permet d'identification de la sensibilité ou la résistance microbienne [93].

A large, light red oval with a thin dark red border, centered on a white background. Inside the oval, the chapter title is written in a black, serif font.

**CHAPITRE IV:
RÉSULTATS ET
DISCUSSION**

IV-1-Les études phytochimiques:**IV-1-1-Les tests préliminaires :**

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

Tableau (IV-1): résultats des tests préliminaires.

La famille	Le résultat
Alcaloïdes	+
Acide aminé	+
Coumarines	+
Carbohydrates	++
Flavonoïdes	+
Phénol	+
Protéine	-
Saponines	++
Stéroïde	-
Tanins	+
Terpenoïdes	+

(-) : absence, (+) : présence.

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

Après avoir terminé la séparation par la colonne de système (7%).on a séparé par la plaque CCM la fraction (F14) après nous avons gratté la bande bleu violète de la plaque CCM , nous obtenons le gel de silice qui porte le produit isolé. Pour tester la pureté de produit isolé, nous avons fondu la poudre dans le moins de méthanol possible et filtré à travers les puits de coton., le filtrat obtenu représente le composé dissolvé dans le méthanol, où nous l'avons analysé dans plusieurs systèmes des solvants, les résultats obtenu sont:

Un seul composé pure de couleur bleu nuit est la fraction (F14*).

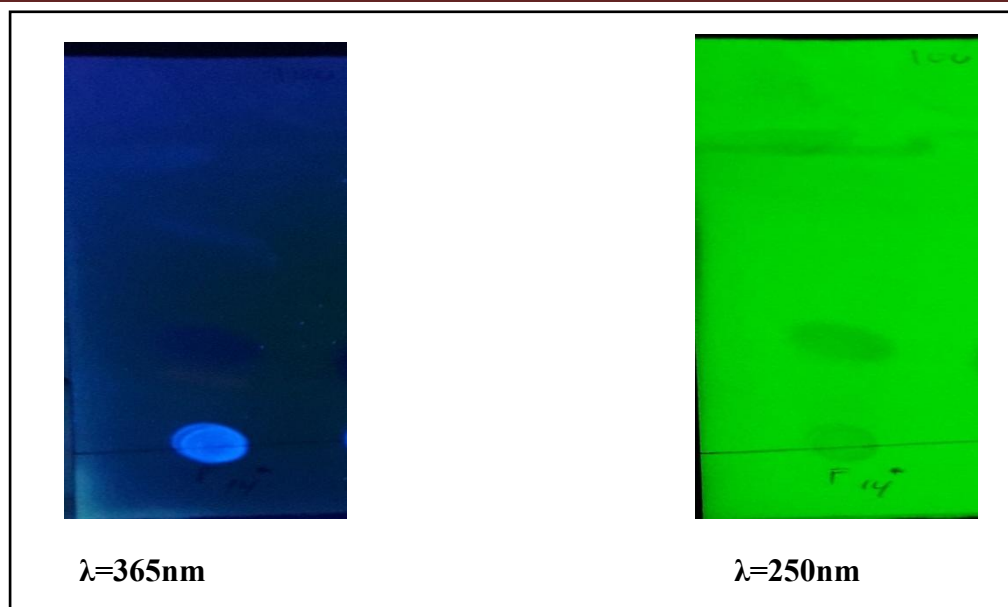


Figure (IV-1): Les résultats de la séparation la fraction (F14*) sous la lumière UV.

Le valeur de Rf pour la Fraction (F14*) est 0.43.

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

A- Dosage des polyphénols totaux:

Les résultats sont exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par 100 gramme d'extrait (mg EAG/100g).

Tableau (IV-2): Les résultats de quantification des polyphénols.

Extrait	AcOET	Aqueuse	Brut
Quantité des polyphénol (mg/100g)	0.13861±0.011	0.2604±0.009	0.293± 0.0326

On a noté que la phase brute contient la plus grande quantité de polyphénol suivie de la phase aqueuse puis la phase acétate.

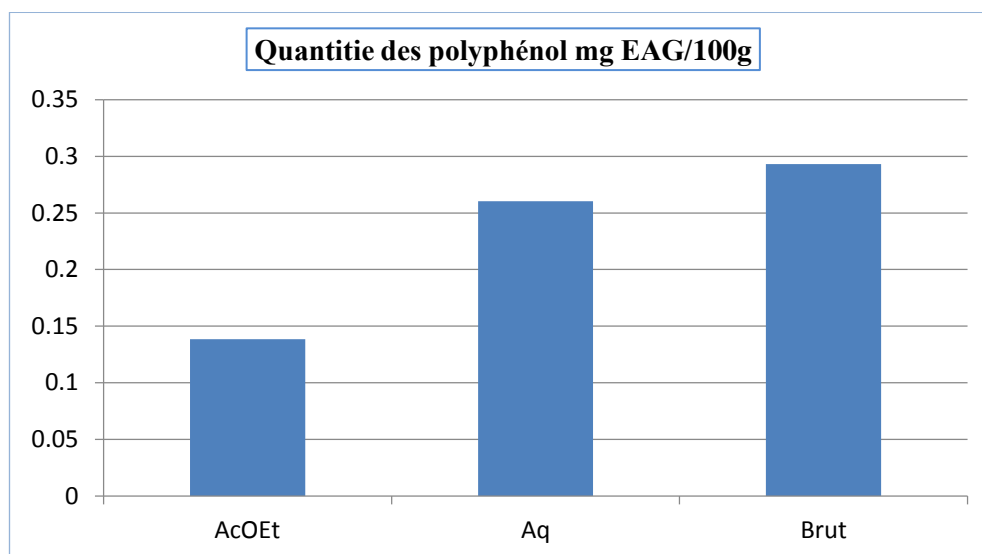


Figure (IV-2): Teneures en polyphénol totaux.

B- Dosage des flavonoïdes :

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercitine par gramme 100 de poids sec de plante (**mg EQE /g**).

Tableau (IV-3): le résultat de quantification des flavonoïdes.

Extrait	AcOET	aqueuse	Brut
Quantité des flavonoïdes (mg/100g).	0.2113±0.0256	0.0306± 0.0008	0.0528±0.0040

Pour les résultats de l'estimation quantitative des flavonoïdes, la phase l'acétate était le pourcentage le plus élevé, suivie la brute puis la phase aqueuse.

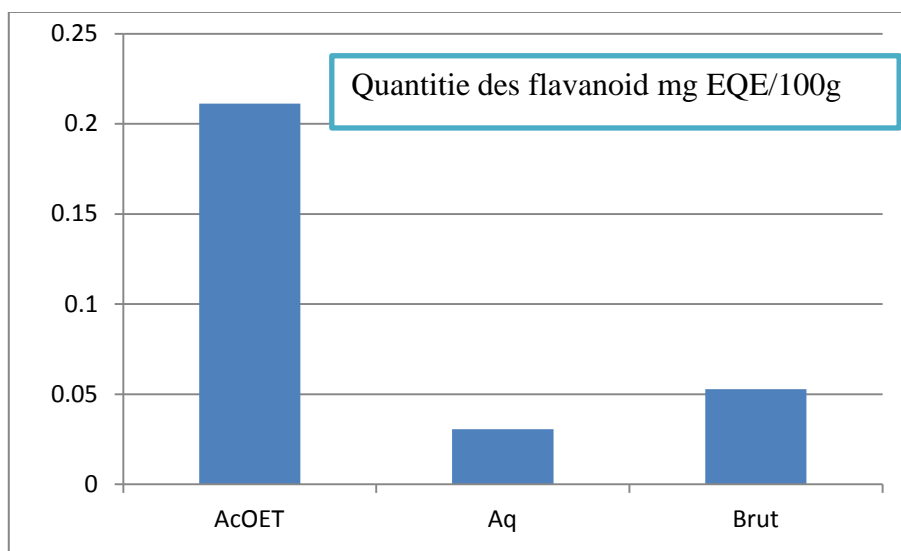


Figure (IV-3): Teneurs en flavonoïdes totaux.

C- Dosage des tanins condensés :

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent la catéchine par 100 gramme de poids sec de la plante (**mg EAC /100g**).

Tableau (IV-4): Les résultats de quantification des tanins.

Extrait	AcOET	Aq	Brut
Quantité des tanins (mg EAC /100g)	0.0498 ±0.0181	0.0736 ±0.0026	0.0539 ±0.0082

Pour les résultats de l'estimation quantitative des Tanins condensés, la phase aqueuse était le pourcentage le plus élevé, suivie par la phase l'acétate et après le brute.

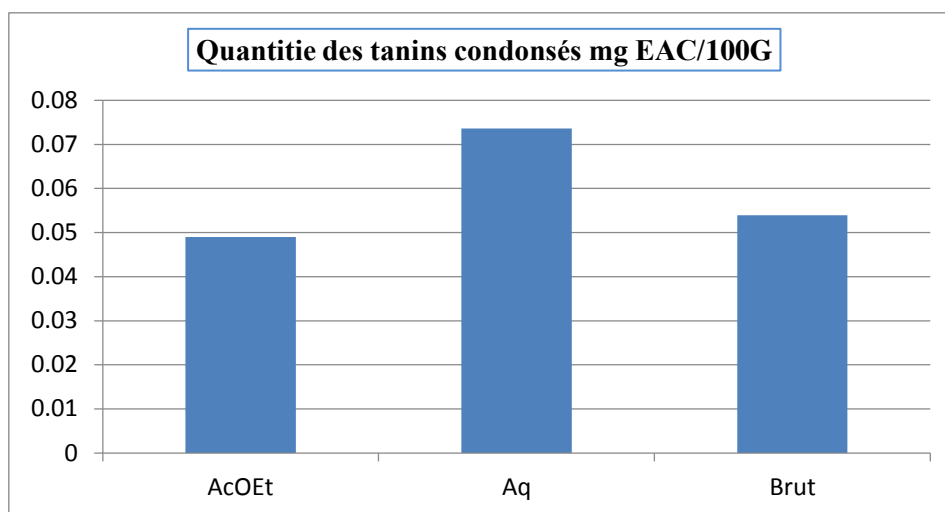
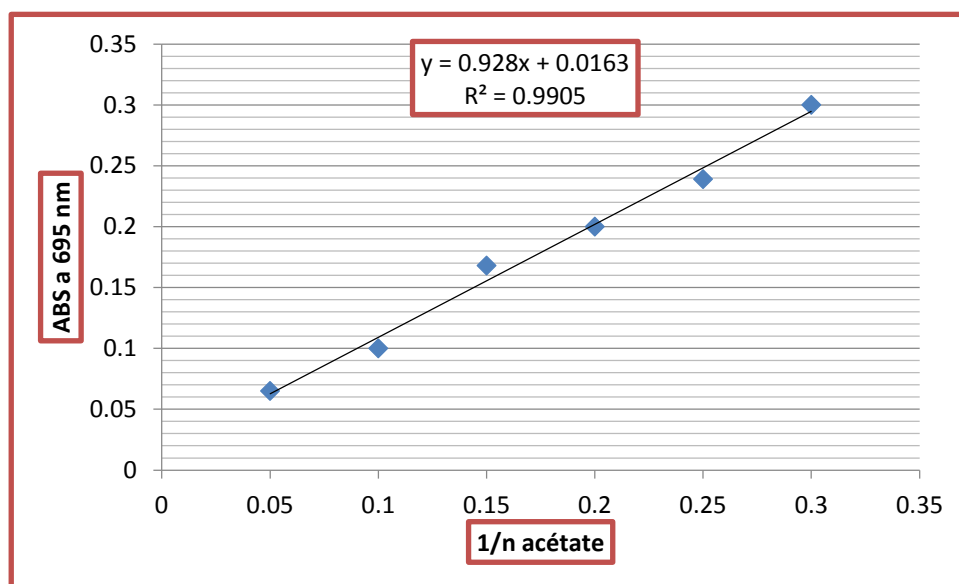


Figure (IV-4): Teneur en tanins condensés.

IV-1-4- Les résultats de l'étude de l'activité antioxydant

IV-1-4-1-Activité antioxydant totale (TAC):

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



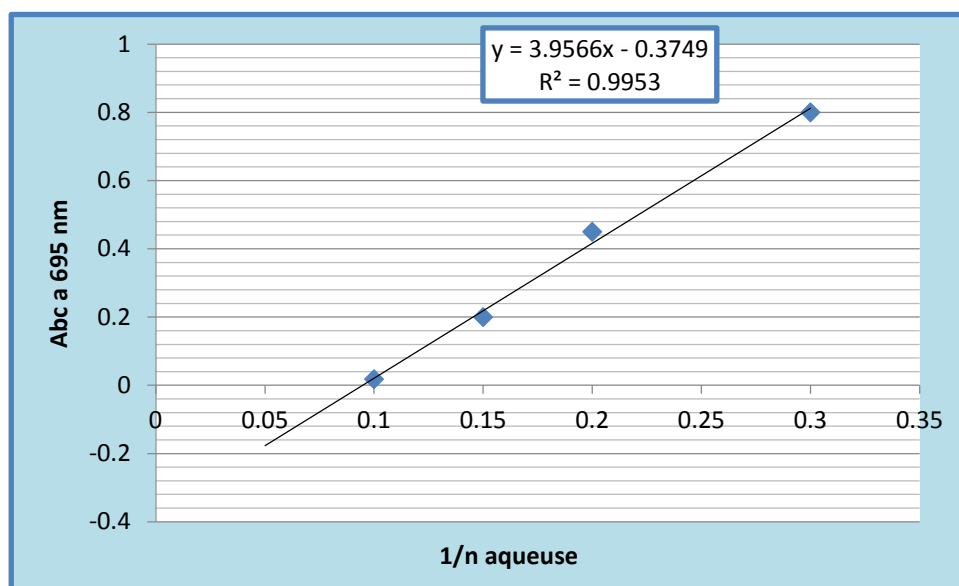


Figure (IV-5): Les courbes de la capacité totale antioxydant des extraits.

La valeur **TAC** a été calculée par l'inverse du nombre des dilutions et des résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau (IV-5) : Les concentrations des extraits correspondant de TAC

Extrait	Q acétate	Q aqueuse
TAC (mM)	0.3013 ±0.018	1.2846 ±0.0309

Nous notons que les résultats de la capacité totale d'efficacité antioxydant correspondent grossièrement aux résultats de l'estimation quantitative des polyphénols, nous trouvons le rapport le plus élevé de la phase aqueuse après la phase acétate.

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

Tableau (IV-6): Résultats de l'Activité anti bactérienne.

Diamètre d'inhibitrice(mm)					Concentration (g/l)	Les extraits
E-coli	Staff	Pseudo	Salmo	Ba		
-	-	-	6mm	6mm	A=100	Extrait E-P
-	-	-	-	-	A=50	
-	-	-	-	-	A=30	
-	9mm	-	8mm	8mm	A=200	Extrait AcOET
-	7mm	-	7mm	7mm	A=100	
-	-	-	6mm	5.5mm	A=50	
-	-	-	5.5mm	-	A=30	
/	9mm	9mm	10mm	8mm	A=500	Extrait aqueuse
	-	6mm	6mm	7mm	A=200	
	-	5.5mm	5mm	6mm	A=100	
	-	-	-	-	A=50	

Les résultats ont montré que l'extrait aqueux donnait l'inhibition du diamètre le plus élevé entre tous les extraits jusqu'à (10mm) à la concentration 500g/l chez la bactérie **Salmonella typhimurum** et la bactérie Escherichia coli est résistante. Ensuite pour les extraits acétate donnait l'inhibition du diamètre (9mm) le plus élevé chez la bactérie staphylococcus aureus, les bactéries Escherichia coli et pseudomonas aeruginosa sont résistantes et pour les extraits éther de pétrole donnait la faible inhibition pour la bactérie **Salmonella typhimurum** et **bacillus subtilis**, les bactéries Escherichia coli et pseudomonas aeruginosa et st sont résistantes.

Quelques résultats du travail suivant :



Figure (IV-6): Les résultats de l'activité antibactérienne.



CONCLUSION

GENERALES

Conclusion générale

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence de nombreux métabolites tels que les tanins, les flavonoïdes, les stéroïdes, les saponines, les alcaloïdes, les coumarines, les carbohydrates, les acides aminés et les protéines.

L'analyse quantitative des trois extraits (acétate d'éthyle, la phase aqueuse et le brut) pour le dosage des polyphénols ont utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu, et les flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium ont révélé des teneurs moyennes de cette plante.

La phase aqueuse contient une quantité majoritaire des tanins par rapport à la phase acétate d'éthyle.

La phase acétate d'éthyle possède une faible quantité des polyphénols et une majorité de flavonoïdes par rapport à la phase aqueuse, et possède une activité antioxydante importante *in vitro*. Il a montré une réduction importante de molybdène Mo (VI).

Pour la séparation, on a utilisé deux méthodes chromatographiques :

1^{er} : Séparation par la colonne de la phase chloroformique, on a choisi la fraction (F14) qui nous a permis d'isoler un composé flavonoïde.

2^{ème} : Séparation par la plaque CCM les fractions

Le test d'efficacité antibactérien de la plante *salsola vermiculata* est effectué sur cinq souches, les résultats montrent que le plus grand diamètre de la zone d'inhibition était la phase aqueuse contre *Salmonella typhimurum*.

Référence:

- [1] Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry* 68 2831–2846.
- [2] Rodrigues, E., (2007). Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology* 111, 295–302.
- [3] Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., and Ignacimuthu, S., (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi:10.1186/1746-4269-2-43.
- [4] Lee, K.G., Mitchell, A., Shibamoto, T .(2000). Antioxidative activities of aroma extracts isolated from natural plants.
- [5] Yawadio-Nsimba, R. , Hiroe-Kikuzaki, H., Konishi, Y.(2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of chenopodium quinoa and amaranthus spp. Seeds. *Food chemistry*. Page 760–766.
- [6] Hertog, G. L. M., Hollman, C. H. P., Putte, V. B.(1993). Content of potentially flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, Page 1242–1246. anticarcinogenic
- [7] Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M.(2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols .*Food chemistry* Page 550–557
- [8] Akerele, Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*, 1993, 28, 13-19.
- [9] JT Baker; RP Borris; B Carte, *J. Nat. Prod.*, 1995, 58, 1325-1325.
- [10] MC Mathabe; RV Nikolova; N Laly; NZ Nyazema, *J. Ethnopharmacol.*, 2006, 107, 286-293.
- [11] Sana Gannouna, Adel Mahfoudhib,c, Guido Flaminid, Ahmed Noureddine Helala and Zine Mighrib* 2016.
- [12] RA Creager, *Weed Technology*, 1988, 2, 369-374.
- [13] Mr MEFTAH Toufik/ A.N.N, (*Cosmétologie au Naturel*), (2003), page 6.
- [15] RP Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy*, 4th Edition, Allured Pub Corp, 1995, 804 p.
- [16] KP Lutta, C Bii; AT Akenga; WC Wanjala, *Rec. Nat. Prod.*, 2008, 2, 116-127.
- [17] E Teuscher; R Anton; A Lobstein, *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 2005, 544 p
- [18] Cde Carvalho, Mda Fonseca, *Food Chem.*, 2006, 95, 413-422.

- [19] A Mahasneh; M Abbas; A Jameel; A A EI-Oqlah, *Phyther. Res.*, 1996, 10(3), 251-253.
- [20] M Znini; M Bouklah; L Majidi ;S Kharchouf; A Aouniti; A Bouyanzer; B Hammouti; J Costa; SS Al-Deyab, *Int J. Electrochem. Sci.*, 2011, 6(3), 691–704.
- [21] KP Lutta, C Bii; AT Akenga; WC Wanjala, *Rec. Nat. Prod.*, 2008, 2(4), 116-127.
- [22] Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique, SaintEtienne.
- [23] Haas, D. (2015). Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens*: exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane, Paris 11.
- [24] Crozier, A., M. N. Clifford, et al. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*, John Wiley & Sons ,1p.
- [25] Seghiri, R. "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*."
- [26] P.Claude Spino , P. Jean Lessard, Notes de cours ,Chimie des Substances Naturelles , Département de Chimie , Université de Sherbrooke 1995-2017 , 10p.
- [27] Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris .
- [28] Urquiaga I. et Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidant and oxidative stress. *Biological Research*, 33(2): 55–64.
- [29] Ganesan, K., Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *nutrients*. Pages 1-17.
- [30] Oliver, S. A. B, Vittorio, O.C., Cirillo, G., Cyrille, B. (2016). Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Formal of the royal society of chemistry*.
- [31] Kundu J.K. and Surh Y. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2): 243– 261.
- [32] Hurtado-Gaitán, E., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Antonio Samper-Herrero. (2017). A focused multiple reaction monitoring (MRM) quantitative method for bioactive grapevine stilbenes by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ).
- [33] Filippis, B., Ammazalorso, M., Fantacuzzi, M., Giampietro, L., Maccallin, R. 2017. Anticancer activity of stilbene-based derivatives, *Journal of Chime Medicine*.
- [34] Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. 2005. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques, 192 pages.

- [35] Casarin, E., Dallacqua, S., Smejkal, K., Šlapetová, T., Innocenti, G., Carrara, M. 2014. Molecular mechanisms of antiproliferative effects induced by Schisandra-derived dibenzocyclooctadiene lignans deoxyschisandrin and gomisin N in human tumour cell lines. *Fitoterapia*. Page 241–247.
- [36] Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. 2009. *Trends in Plant Science*, 14 (3), 125–132.
- [37] Bruneton J. 2009. *Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales*. 4ème édition. Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales 1292 p.
- [38] Tabart, J. (2011). *Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire*, Université de Liège, Liège, Belgique.
- [39] Vogt T. 2009. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3: 2–20.
- [40] Dixon R.A and Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 394–400.
- [41] Van Tunen A.J., Mur L.A., Brouns G.S., Rientra J.D., Koes R.E. and Mol J.N.M. 1990. Pollen and specific CHI promoters from *Petunia*: Tandem promote regulator of the CHI A gene. *Plant Cell*, 393–401.
- [42] Mompon B, Lemaire B, Mengal P, Surbled M. Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle. in *Polyphenols*. 1996. Bordeaux.
- [43] Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 2004;35: 379-387.
- [44] Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd)*, Lavoisier, 375 p
- [45] Thèse de magistère Benaissa Wahiba Université Constantine -Algérie.
- [46] Markham, K.R., *The techniques of flavonoids identification*, pressed s (1982) academic.
- [47] Harborne, J.B., *The Flavonoids*, V.1, eds Chapman and Hall (1975).
- [48] Nielsen, J. G. and Moller J. (1970). *Acta Chem. Scand.*, 24, 2665.
- [49] Berthillier, A. (1972). *La chromatographie et ses applications*», Dunod paris
- [50] Harborne, J. B. (1975). *Flavonoids in phytochemistry*, Vol. II, Edition Lawrence P. L, Vol. II, Litton Educational Publishing.
- [51] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). *The phenolic compounds of vegetals*, Edition Dunod, Paris.
- [52] Jurd, L. and Horwitz, R. (1962). *Spectral Properties of flavonoid Compounds* In Geissman, T.A. *The chemistry of flavonoid compounds*. 107-155. Pergamon Press New-York.

- [54] Carreau, J.-P. and J. Raulin (1964). "Séparation des isomères géométriques d'acides gras monoéthyléniques sur couche mince de talc. Dosage semiquantitatif. *Journal of Chromatography A* **15**: 186-190, 66p.
- [55] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [56] Bacon J.D., Mabry T.J. and Mears J.A. 1976. UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Revue Latioam Quim*, **7**: 83–86.
- [57] Negrette, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Eraso.S., Garcia, R., Avendano, S. (1987). *Plantes Med et phytotherapia*, XXI n°2 P 168-172
- [58] Jurd L. and Geissman T.A. 1956. Absorption spectra of metal complexes of flavonoids compounds. *Journal of Organic Chemistry*, 21(12): 1395–1401.
- [59] Wilson R.G., Bowie, J.H. et Williams, D.H. (1986). *tetrahedron*, 24.1407.
- [60] Gunther, H. (1994). *La spectroscopie de RMN*, Masson, Paris.
- [61] Markham, K.R. (1976), *C¹³ NMR of flavonoids-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones*. *Tetrahedron*, 32, PP. 2607-2612.
- [62] Laid, Z. (2016). *Etude Phytochimique et Evaluation biologique des extraits organiques des différents Parities de limonastrium Feei-Blombaginaceae-(Mlefat- Khadem)*
- [63] Nielsen, J. G. and Moller J. (1970). *Acta Chem. Scand.*, 24, 2665.
- [64] Audier, H. (1966). *Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse*.
- [65] Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with-cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 2004; 35: 379-387.
- [66] Mochizuki M, Yamazaki S-i, Kano K, Ikeda T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 2002;1569: 35-44.
- [67] Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 2004;35:379-387.
- [68] Friedman M, Jurgens HS. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic CompoAgric. *Food Chem.* 2000;48:2101-2110.
- [69] Grohmann K, Manthey JA, Cameron RG. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research* 2000;328:141-146.

- [70] Fargeix D, Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoides en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoides. 2000, Université Claude Bernard- Lyon .
- [71] Makris DP, Rossiter JT. An investigation on structural aspects influencing producted formation in enzymatic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols.2001; 77;177.
- [72] Kubo I, Nihei K-i, Shimizu K. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004;12:5343-5347.
- [73] Makris DP, Rossiter JT. High performance liquid chromatography studies on free radical oxidation of flavonols. *Special Publication-Royal Society of chemistry* 2000;225:249-251.
- [74] Wolfe K.L., Liu R.H. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agricult. Food Chem.*, 56, 8404-8411.
- [75] Mercader A. G., Duchowicz P. R., Fernández F. M., Castro E. A., Bennardi D, Autino J. C, Romanelli G. P. (2008). Qsar prediction of inhibition of aldose.
- [76] Musialik M, Kuzmicz R, Pawtowski T.S, Litwinienko G. (2009). Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem*, 74, 2699-2709.
- [77] Wagner, H., Rüger, R. and Farkas, L. (1977) *Chem. Ber.* 110, 737-743.
- [78] Mashimo, K. and Sato, Y (1970), 26(3): 803-812.
- [79] Bruneton, J, (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* Editions TEC & DOC, 3ème édition, PP 783- 785.
- [80] Zenk, M.H., Juenger, M. (2007) Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review* 68, 2757 – 2772.
- [81] Roberts M.F. and Wink M., (1999). Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews / Phytochemistry*, 52, 1177 – 1180.
- [82] Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H, Stöckigt, D, (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic –electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups *Review Journal of Chromatography*, 967, 85–113.
- [83] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Nat. Prod. Rep.* 2000, 17, 215-234.
- [84] Pour une classification détaillée des alcaloïdes selon leurs précurseurs biologiques , voir : Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [85] Sertürner, F. W. A. *Trommsdorff's, J. Pharm.* 1806, 14, 225.
- [86] Laurent, A. *Ann. Chim. Phys.* 1847, 19, 359.

- [87] Borman, L. S; Kuehne, M. E. The Alkaloids; Brossi, A, Suffness, M., Eds; Academic: San Diego,1990; Vol. 37, p 133. (d) Fahy, J. Curr. Pharm. Design 2001, 7, 1181-1197.
- [88] Pearce, H. L. The Alkaloids; Brossi, A., Suffness, M., Eds.; academic: San Diego, 1990; Vol. 37, p 145.
- [89] Belguidoum, M., H. Dendougui, et al. (2015). "Antioxidant activities, phenolic, flavonoid and tannin contents of endemic *Zygophyllum Cornutum* Coss. From Algerian Sahara. Der Pharma Chemica 7: 312-317 ,313p.
- [90] Singleton V.L. et RossiJ.A; J. Eol.Vitic, 16:144-158 (1965).
- [91] Prieto, P., M. Pineda, et al. (1999). "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum.
- [92] Amzazi , P. S, P. Y. Bakri, et al. "Caractérisation phytochimique et propriété antiproliférative, antibactérienne et antiparasitaire de seize plantes médicinales."
- [93] B. Kablan, M. Adiko, and D. Abrogoua, Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 2008. 6(5): p. 282-288.

المراجع العربية:

- [14] عماد الدين افندي, (كتاب اطلس نباتات البادية السورية /اكساد) , الطبعة الثانية 2013 , دار الشرق العربي للطباعة والنشر والتوزيع ,الصفحة 48-49 .
- [45] ح. عمر, ايمان حسام محمد, التشخيص النوعي والطيفي والتقدير الكمي لبعض المكونات الفعالة لنبات الشنان من نوع *Seidlitzia Rosmarinus* ودراسة فعاليتها ضد البكتيريا المرضية وإمكانية استخدامه في صناعة الصابون, مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة, المجلد السابع , العدد الثاني لسنة 2013.

المخلص:

- أنجزت هذه الدراسة من اجل فصل الفلافونيدات و لمعرفة النشاطية المضادة للأكسدة والنشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلص العضوي و المائي ; حيث أظهرت المستخلصات نشاطية ضد تاكسدية و نشاطية ضد البكتيريا حيث كانت نتائج التقدير الكمي الإجمالي لعديدات الفينول الكلية بطريقة folin-ciocelten بالنسبة للمستخلص العضوي الاسيتات بنسبة 0.1386 ± 0.011 و الطور المائي بنسبة $(0.2604 \pm 0.009 \text{ mg EAG}/100\text{g})$.
- ونتائج للتقدير الكمي للفلافونيدات trichlorure d'aluminium بنسبة 0.2113 ± 0.0256 للطور العضوي الاسيتات و 0.0306 ± 0.0008 ب $(\text{mg EQE}/100\text{g})$.
- أظهر كلا من الطورين انه مثبط للنشاط البكتيري حيث الطور المائي مثبط لجميع أصناف البكتيريا التالية:
Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis
والطور العضوي اسيتات مثبط لأصناف البكتيريا التالية:
Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis
الكلمات الدالة: الفلافونيدات, المضادة للأكسدة, المضادة للبكتيريا, الاسيتات, عديدات الفينول.

Résumé:

Notre étude s'articule dans la séparation des flavonoïde et l'étude des activités antioxydants et antibactérienne des extrait organique et aqueux. Les résultats de l'estimation quantitative des polyphénols totaux obtenus par la méthode de la Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium. Les taux en polyphénol de l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse 0.1386 ± 0.011 et 0.2604 ± 0.009 (mg EAG/100g) respectivement. Les taux en flavonoïde de l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse est 0.2113 ± 0.0256 et 0.03306 ± 0.0008 (mg EQE/100g) respectivement.

Les testes antibactérienne la phase acétate d'éthyle sont bactéricides Vis-Vis de Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis et pour la phase aqueux bactéricides Vis-Vis de Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa.

Mots-clés: flavanoïde, activités antioxydants, antibactérienne, Folin-Ciocalteu.

Abstract:

Our study articulates in the separation of the flavonoïde and the study of the antioxydants activities and antibactérienne of organic and aqueous extract. The Results of the quantitative estimate of total polyphenols obtained by the method of Folin-Ciocalteu and the total flavonoïdes by the trichloride method of aluminium. Polyphenol rates in the ethyl acetate and the aqueous phase 0.1386 ± 0.011 and 0.2604 ± 0.009 (mg EAG/100g) respectively.

Les rate in flavonoïde of the ethyl acetate and the aqueous phase is 0.2113 ± 0.0256 and 0.03306 ± 0.0008 (mg EQE/100g) respectively.

The antibactérienne test of the ethyl acetate phase are bactericidal Vis-Vis of Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis and for the aqueous phase is bactericidal Vis-Vis of Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurum, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa.

Keyword: the flavanoïde, antioxydants activities, polyphénols, acetate ethyle.