

# UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences et Technologie

et des Sciences de la Matière

Département des Sciences de la Matière



## Mémoire

## MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Appliquée

Présenté par : MAHDJAR Salha

Thème

*Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante*

Soutenu le 20/06/2013

Devant le jury composé de :

Melle HAMMOUDI Rokia	MA (A)	Univ K. M Ouargla	Présidente
Mme DEHAK Karima	MC (B)	Univ K. M Ouargla	Examinatrice
M HADJ-MAHAMMED Mahfoud	Prof	Univ K. M Ouargla	Rapporteur
Mme BOUZIANE Mebarka	MA (A)	Univ K. M Ouargla	Co-Rapporteur

Année Universitaire 2012-2013



*Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mon cher père*

*A ma chère mère*

*A mes sœurs*

*A mes frères*

*A ma famille*

*A toutes mes amies et surtout Haf et Souad*

*A toute personne qui me connaît*

*Salha*

## Remerciements

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements :*

*au professeur HADJ-MAHAMMED Mahfoud, directeur du laboratoire Biogéochimie des Milieux Désertiques à l'université Kasdi Merbah Ouargla, rapporteur de ce mémoire*

*A Madame BOUZIANE Mebarka, Maître assistante classe A, à l'université Kasdi Merbah Ouargla, co-rapporteur de ce mémoire*

*Pour m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et de m'avoir guidé durant la préparation de mon mémoire de Master. Ce travail témoigne de leur confiance et de leur soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je remercie Mme DEHAK Karima, Maître de conférences classe B et Melle Hammoudi Roukia, Maître assistante classe A, à l'université Kasdi Merbah Ouargla d'avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Je remercie tous les enseignants, les étudiants et les travailleurs de l'université d'Ouargla et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation pédagogique et scientifique.*

*Je remercie tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et encouragements : tous les membres de notre laboratoire et tous les collègues de ma promotion, je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.*

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des Figures	
Liste des spectres	
Introduction	

### Première partie: Synthèse bibliographique

#### *Chapitre I : Généralités botaniques*

I-1- La famille botanique des Astéracées.....	1
I-1-1- Généralités .....	1
I-1-2-Systématique .....	2
I-2-Le genre <i>Matricaria</i> .....	3
I-2-1-Systématique .....	3
I-2- 2-Répartition géographique et Caractéristiques botaniques.....	3
I-2-3-Usages traditionnels .....	3
I-2-4-Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Matricaria</i> .....	6
I-2-4-1-Les flavonoïdes .....	6
I-2-4-2-Intérêts pharmacologiques des Flavonoïdes isolés du genre <i>Matricaria</i> .....	10
I-2-4-3- Autres Constituants .....	11
I-2-4-3-a- Coumarines .....	11
I-2-4-3-b- Amides .....	13
I-2-4-3-c- Autres Constituants .....	13
I-3-Présentation de la plante étudiée .....	13
I-3-1Caractéristiques botaniques.....	13
I-3-2-Répartition géographique .....	14
I-3-3-Médecine traditionnelle et connaissances locales.....	14
I-3-4-Place dans la systématique .....	15
I-3-5-Composés Chimiques isolés de la plantes <i>Matricaria pubescens</i> .....	15

#### *Chapitre II: Les flavonoïdes*

II-1- Introduction .....	16
II-2- Définition .....	16
II-3- Nomenclature.....	17
II-4- La biosynthèse.....	18
II-5- Synthèse organique des flavonoïdes.....	19
II-6- Structure chimique et substitution.....	21
II-7- Exemples de quelques classes de flavonoïdes .....	22

II-8- Substitution du squelette flavonique .....	23
II-8-1- La O- substitution .....	23
II-8-1-1- L'hydroxylation .....	23
II-8-1-2- La méthylation .....	24
II-8-1-3- L'O-glycosylation .....	25
II-8-2- La C- substitution.....	25
II-8-2-1- La C-méthylation .....	25
II-8-2-2 -La C- glycosylation .....	25
II -9- Propriétés biologiques .....	26
II-9-1-Intérêt vis-à-vis des plantes .....	26
II-9-2- Intérêt pharmacologique .....	26
II-9-3-Activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	27
II-9-4-Piégeage direct de radicaux libres .....	27
II-9-5- Chélation des ions métalliques .....	29

## Deuxième partie: Partie expérimentale

### *Chapitre III: Matériels et méthodes*

III-1- Matériel végétal.....	30
III-2-Méthode d'Extraction .....	30
III-2-1-Protocole d'extraction .....	30
III-2-1-a- Extraction au méthanol/Eau .....	30
III-2-2 -b-Extraction liquide-liquide .....	30
III-2-1- b-1- Affrontement par l'acétate d'éthyle .....	30
III-2-1-b-2-Affrontement par le butanol .....	30
III-3- Méthodes de séparations chromatographiques .....	32
III-3-1-Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) .....	32
III-3-1-1-Protocole de CCM sur gel de silice.....	32
III-3-1-2- Protocole de CCM sur gel de polyamide.....	32
III-3-1-3- Protocole de CCM sur gel de cellulose .....	33
III-3-1-4-Chromatographie préparative sur couche mince (CCM) .....	33
III-3-2-Chromatographie sur papier (CP) .....	34
III-3-2-1-La chromatographie analytique sur papier Wathman .....	34
III-3-2-2-La chromatographie préparative sur papier Wathman .....	35
III-3-3-Facteur de rétention (Rf).....	35
III-3-4- Chromatographie sur colonne de gel de silice .....	36
III-4- Les techniques d'identification structurale .....	38
III-4-1-La spectrophotométrie UV-visible .....	38
III-4-2-La spectrophotométrie IR .....	38
III-5-Activité antioxydante .....	39

## Chapitre IV: Résultats et discussion

IV-1-Extraction des flavonoïdes .....	41
IV-2-Diagnostic par CCM analytique.....	41
IV-3-Etude de l'extrait brut par différentes méthodes chromatographiques	44
IV-3-1-Chromatographie sur couche mince CCM .....	44
IV-3-2-Chromatographie sur papier bidimensionnelle.....	44
IV-3-3-Chromatographie sur colonne (CC) .....	46
IV-3-3-1-Résultats de séparation sur colonne ouverte .....	46
IV-3-3-2-Etude chromatographique de quelques fractions	
IV-3-3-2-1- Chromatographie sur couche mince.....	48
IV-3-3-2-1-a- la fraction A1 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 100%).....	48
IV-3-3-2-1-b- la fraction A2 (97/3) .....	48
IV-3-3-2-1-c- la fraction A3 (97/3) .....	49
IV-3-3-2-1-d- la fraction A7 (94/6) .....	49
IV-3-3-2-1-e- la fraction A10 (94/6) .....	50
IV-3-3-2-1-f- la fraction A11 (90/10).....	51
IV-3-3-2-1-g- la fraction A18 (90/10) .....	52
IV-3-3-2-1-h - la fraction A19 (80/20) .....	53
IV-3-3-2-1-i - la fraction A20 (80/20) .....	53
IV-3-3-2-2-Chromatographie sur papier bidimensionnelle.....	54
IV-3-3-2-2-a- la fraction A7 (94/6) .....	54
IV-3-3-2-2-b- la fraction A18 (90/10) .....	55
IV-3-3-2-2-c- la fraction A20 (80/20) .....	58
IV-3-3-2-3-Purification de quelques fractions.....	57
IV-3-3-2-3-a-Purification de la fraction A7 .....	57
IV-3-3-2-3-b-Purification de la fraction A18.....	58
IV-4-Analyses structurales des produits.....	63
IV-4-1-Analyse par la spectrophotométrie-IR.....	63
IV-4-1-a- Le produit (1) issu de la fraction 94/6.....	63
IV-4-1-b- Le produit (2) issu de la fraction 80/20 .....	64
IV-4-2-Analyse par la spectrophotométrie UV-Vis.....	66
IV-4-2-a- Le produit (2) issu de la fraction 80/20.....	66
IV-4-2-b- Le produit (3) issu de la fraction 80/20.....	66
V-5-Activité antioxydante par la méthode de FRAP .....	69

Conclusion

Références bibliographiques

# Liste des abréviations

A1, A2, et B1, B2... Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude

AA : Acide ascorbique

AcOEt : Acétate d'éthyle

BuOH : Butanol

CC Chromatographie sur Colonne ouverte

CCM Chromatographie sur couche mince

CP : Chromatographie sur papier

EOR : Espèces oxygénées réactives.

EtOH : Ethanol

FRAP: Pouvoir Antioxydant de Réduction Ferrique

FT-IR: Infrarouge à transformée de Fourier

MEC: Méthyl Ethyle Cétone

MeOH : Méthanol

Rf : Facteur de rétention

R : Radicaux

TPTZ: 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-1, 3, 5-s-triazine

Tol: Toluène

UV-Vis : Ultraviolet/Visible

# Liste des tableaux

<b>Tableau I : Quelques constituants chimiques de la camomille (<i>Matricaria recutita</i>).</b>	<b>2</b>
<b>Tableau II: Quelques usages traditionnels de certaines Matricaires dans le monde</b>	<b>4</b>
<b>Tableau III : Flavonoïdes isolés du genre <i>Matricaria</i></b>	<b>7</b>
<b>Tableau IV: Relation entre structure et effet pharmacologique des flavonoïdes isolés du genre <i>Matricaria</i>.</b>	<b>10</b>
<b>Tableau V: Dérivés coumariniques isolées de quelques espèces du genre <i>Matricaria</i></b>	<b>11</b>
<b>Tableau VI: Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes</b>	<b>22</b>
<b>Tablea VII : Le système d'élution et le nombre de fraction collectée du serpolet</b>	<b>37</b>
<b>Tableau VIII : Couleurs et rendements des extraits obtenus</b>	<b>41</b>
<b>Tableau IX: Relation entre structure et couleur de flavonoïdes.</b>	<b>42</b>
<b>Tableau X: Relation entre le Rf et les structures des flavonoïdes.</b>	<b>43</b>
<b>Tableau XI: principaux tests permettant la détection des composés flavoniodique</b>	<b>43</b>
<b>Tableau XII: fluorescence et Rf des tâches sur CCM d'extrait brute</b>	<b>44</b>
<b>TableauXIII: fluorescence et Rf des tâches sur CP d'extrait brute</b>	<b>45</b>
<b>Tableau XIV: Résultats de séparation par CC de l'extrait acétate d'éthyle</b>	<b>47</b>
<b>Tableau XV: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fraction A1</b>	<b>48</b>
<b>TableauXVI : fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fraction A2</b>	<b>49</b>
<b>TableauXVII : fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fraction A3</b>	<b>49</b>
<b>TableauXVIII: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fraction A7</b>	<b>50</b>
<b>Tableau XIX: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fraction A10</b>	<b>50</b>
<b>Tableau XX: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A11</b>	<b>51</b>
<b>TableauXXI fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A11</b>	<b>51</b>
<b>Tableau XXII:: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A18</b>	<b>52</b>
<b>TableauXXIII: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A18</b>	<b>52</b>
<b>Tableau XXIV: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A19</b>	<b>53</b>
<b>TableauXXV: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de fracion A20</b>	<b>54</b>
<b>Tableau XXVI: fluorescence et Rf des tâches sur CP de fraction A7</b>	<b>54</b>
<b>Tableau XXVII: fluorescence et Rf des tâches sur CP de fraction A18</b>	<b>55</b>
<b>TableauXXVIII : fluorescence et Rf des tâches sur CP de fraction A20</b>	<b>56</b>
<b>TableauXXIX : fluorescence et Rf des bandes sur CP de fraction A7</b>	<b>57</b>
<b>TableauXXX: fluorescence et Rf des taches sur CP des produits purifie</b>	<b>57</b>
<b>TableauXXXI: fluorescence et Rf des bandes sur CCM de fraction A18</b>	<b>59</b>
<b>TableauXXXII: fluorescence et Rf des taches sur CP des produits purifie</b>	<b>60</b>
<b>TableauXXXIII: Déplacements des maximums des bandes I et II remarqués dans le méthanol des principales classes de flavonoïdes</b>	<b>68</b>



# Liste des figures

<b>Figure 1: la plante <i>Matricaria pubescens</i></b>	<b>15</b>
<b>Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes</b>	<b>18</b>
<b>Figure 3 : Mécanisme général de biosynthèse des flavonoïdes</b>	<b>19</b>
<b>Figure4: Voies rétro synthétiques d'accès au squelette flavonoïde</b>	<b>19</b>
<b>Figure5: Squelette de chalcone (1), de dihydrochalcone (2)</b>	<b>20</b>
<b>Figure 6: Synthèse de la Flimichapparin</b>	<b>20</b>
<b>Figure7: Les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes</b>	<b>21</b>
<b>Figure 8 : Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.</b>	<b>21</b>
<b>Figure 9: Réaction des flavonoïdes avec les EOR</b>	<b>27</b>
<b>Figure 10 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes</b>	<b>28</b>
<b>Figure 11: Flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques</b>	<b>29</b>
<b>Figure12 : Protocole d'extraction des flavonoïdes</b>	<b>31</b>
<b>Figure 13 : Réduction du Fe(III) -TPTZ en Fe(II) -TPTZ.</b>	<b>39</b>
<b>Figure 14: Chromatogrammes (CP) de l'extrait brut (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) NH<sub>3</sub> +UV</b>	<b>45</b>
<b>Figure15: Chromatogramme (CP) de la fraction A7 (UV, NH<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub> +UV)</b>	<b>54</b>
<b>Figure16: Chromatogrammes (CP) de la fraction A18 (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub> +UV)</b>	<b>55</b>
<b>Figure17 : Chromatogrammes (CP) de la fraction A20 (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub> +UV)</b>	<b>56</b>
<b>Figure 18: Chromatogramme (CCM) sur cellulose des produits regroupés Révélés par (UV, NH<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub> +UV)</b>	<b>58</b>
<b>Figure 19: Test CCM sur cellulose pour regroupement des produits séparés d'A18 (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub> +UV)</b>	<b>61</b>
<b>Figure 20: Résumé de fractionnement et de regroupement</b>	<b>62</b>
<b>Figure 21: Forme benzoyle</b>	<b>68</b>
<b>Figure 22 : Forme cinnamoyle</b>	<b>69</b>
<b>Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique par la méthode FRAP</b>	<b>70</b>
<b>Figure 24: Représentation graphique des résultats du test FRAP</b>	<b>71</b>

# Liste des spectres

<b>Le spectre 1 : Analyse par FT-IR du produit (1) issu de la fraction 94/6</b>	<b>63</b>
<b>Le spectre2 : Analyse par FT-IR du produit (2) issu de la fraction 80/20</b>	<b>64</b>
<b>Le spectre3: Analyse par UV du produit (2)</b>	<b>66</b>
<b>Le spectre4: Analyse par UV du produit (3)</b>	<b>66</b>

# *Introduction*

## Introduction

La médecine par les plantes est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la médecine par les plantes n'a jamais cessé d'évoluer. De nos jours ces deux types de médication se retrouvent intimement liés puisque le modèle moléculaire de la plupart des médicaments mis sur le marché, ont pour origine la plante[1].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols des végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins [3].

C'est dans ce contexte, que notre travail va s'inscrire vu l'implication de notre laboratoire (Biogéochimie des milieux désertiques), dans cet axe de recherche consacré principalement à la phytochimie et à l'évaluation biologique des plantes sahariennes reconnues médicinales de façon traditionnelle.

Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmacologique des plantes médicinales sahariennes, dans le double but de valoriser et de rationaliser leurs usages traditionnels et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiels [2].

Notre travail consiste en une contribution à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Matricaria pubescens* de la famille des composées. Comme la durée pour la réalisation de ce mémoire est limitée, nous réaliserons quelques étapes de base dans cette étude mais qui doivent être complétées par des analyses structurales appropriées ultérieurement pour finaliser l'aspect phytochimique de ce travail.

Notre travail se répartit donc comme suit :

- 1- Etude botanique sur la plante « *Matricaria pubescens* » (classification, description, et utilisation, .....).
- 2- Étude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, la biosynthèse et l'activité biologique des flavonoïdes.
- 3- Extraction des polyphénols contenus dans la plante étudiée.
- 4- Analyse des extraits par Chromatographie sur papier et sur couche mince.
- 5- Fractionnement d'un extrait par chromatographie sur colonne ouverte.
- 6- Purification de quelques fractions isolées
- 7- Analyse spectrale de quelques produits et tentative de leur identification.
- 8- Test de l'activité antioxydant de l'extrait étudié par la méthode FRAP.

*Première partie*  
*Synthèse bibliographique*

*Chapitre I*  
*Généralités botaniques*

## **I-1- Famille des Astéracées :**

### **I-1-1 Généralités:**

La famille des Astéracées comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces et en France 111 genres et 638 espèces. Cette vaste famille est économiquement importante, vu que plusieurs de ses plantes sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc).

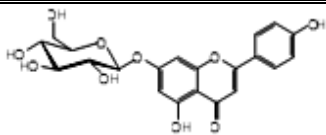
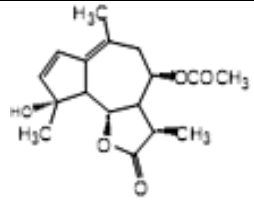
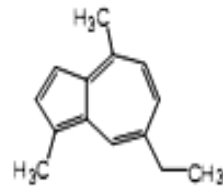
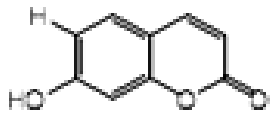
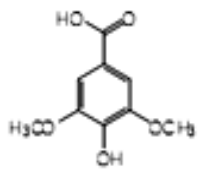
Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie, En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de certaines plantes de cette famille, tels que le Semen-contra (*Artemisia cina Berge*), l'Arnica (*Arnica montana L.*), la Chamomille (*matricaria chamomilla L* Et *Anthemis nobilis L*), le pied de chat (*Antenaria dioca gartn*) possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle. Une des propriétés typiques de la famille des Astéracées est sa richesse en composés naturels divers.

Les principes amers, les corps insaturés, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes., principaux constituants chimiques des Astéracées expliquent la diversité de leurs activités pharmacologique [4] [5].

Le Tableau I montre la variation en constituants chimiques d'une espèce de la famille des Astéracées ayant une valeur alimentaire et médicinale qui est la camomille (*Matricaria recutita L.*)



**Tableau I: Quelques constituants chimiques de la camomille (*Matricaria recutita*).**

Constituants chimiques	Nom trivial	Structure
Flavonoïde	Apigénine-7-O-glucoside	
Sesquiterpène lactone	Matricine	
Huile essentielle	Chamazulène	
Coumarine	Ombelliférone	
Acide phénolique	Syringique	

**I-1-2-Systématique [5]**

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)

Embranchement : Phanerogamae (Phanérogames)

Sous-embranchement : Magnoliophytina (Angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (Dicotyledones)

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae (Compositae)

## **I-2-Le genre *Matricaria* : [6]**

*Matricaria* est un genre de plantes à fleurs de la famille Asteraceae. Certaines de ces espèces ont le nom commun de "matricaire", mais ce nom se réfère également à des plantes non dans ce genre.

### **I-2-1-Systématique [6] :**

Règne : Plantae

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae

Sous-famille: Asteroideae

Tribu: Anthemideae

Sous-tribu : Matricariinae

Genre: *Matricaria*

### **I-2. 2. Répartition géographique et caractéristiques botaniques [ 6]:**

La plupart des matricaires sont très fréquents dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie, et en Amérique, ainsi que dans le nord et le sud de l'Afrique, et certaines sont naturalisées en Australie. *M. occidentalis* est originaire de l'Amérique du Nord; d'autres espèces ont été introduites.

Les matricaires sont des plantes annuelles de 50 centimètres à 1,5 m de hauteur, à tige dressée, rameuse. Les feuilles, alternes, sessiles, épaisses, charnues, sont très divisées, en lanières. Les fleurs, jaunes au centre, blanches à la circonférence, très odorantes, sont groupées en capitules solitaires au sommet des rameaux. Le fruit est très petit, blanc jaunâtre, légèrement arqué.

### **I-2-3-Usages traditionnels [2] :**

Le tableau II représente les multiples usages traditionnels de quelques Matricaires de part le monde.

**Tableau II: Quelques usages traditionnels de certaines Matricaires dans le monde**

<b>Espèce</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Partie utilisée</b>	<b>Voie</b>	<b>Usage</b>	
<i>M. aurea</i>	Israël	Plante entière	Orale	Traitement de l'hypoglycémie	
<i>M. chamomilla</i>	Russie	Fleurs	Externe	Contre le vieillissement prématuré de la peau	
	Allemagne	Fleurs	Orale	Spasmolytique antiviral	
	Hongrie			Antimicrobien antifongique	
	Bulgarie	Plante entière	Orale	Intensifier le tonus de l'utérus	
	Italie	Plante entière	Orale	Sédative, dative, spasmolytique	
	République tchèque	Plante entière	Externe Orale	Antispasmodique, Anti-inflammatoire Antiseptique	
	Japon	Plante entière	Externe	Orale	Antimutagénique Eclaircissement de la peau Inhibe la production des mélanocytes Antimutagène Hydratant Traitement de l'eczéma Traitement des dermatites atopiques Traitement de l'exoroderma sénile Antioxydant Tonique amer, eureptique Antispasmodique Anti-inflammatoire
					Fleurs
	Espagne	Pollen			Conjonctivite Produits cosmétiques Dermatologique Stimule la croissance des Cheveux Conjonctivite
		Plante entière	Externe		
	Iraq			Injection	Anti-inflammatoire
	Yougoslave	Plante		Entière Orale	Ulcère
	Iran				Antioxydant
Pologne	Plante entière		Inhalation	Anti-allergique	
France	Plante entière			Antiviral Anti-herpétique	
<i>M. indica</i>	Chine	Plante entière	Orale Externe	Anti-cancer Traitement des cheveux Hypertendus Pneumonie des bébés	
<i>M. inodora</i>	France	Plante entière		Antiviral Anti-herpétique	
<i>M. nigellifolia</i>	Angleterre	Plante entière		Désordre nerveux	

<i>M. Matricarôïds</i>	Japon			Anti-inflammatoire
<i>M. pubescens</i>	Maroc Algérie	Plante entière	Orale	Affections gastro-intestinales Calculs biliaires Tumeurs internes Otites Rhumatismes Sciatiques Névralgies Parfumer le beurre fondu
<i>M. recutita</i>	Argentine	Fleurs	Orale	Spasmolytique Sédative
	EX.URSS	Plante entière		Antioxydant
	Brésil			agents Antisolaires
	Italie			Antimycotique Anti--inflammatoire (respiratoire,gastroentérique) Alimentation des enfants Anti-inflammatoire Anti-ulcère Cicatrisant de la peau
	Egypte	Plante entière		Anti-ulcère
	Lituanie	Plante entière		Antioxydant
	Allemagne	Plante entière		Anti-inflammatoire Antiseptique Spasmolytique
	Suisse	Fleurs	Orale	Antispasmodique Digestif Diurétique
			Externe	Anti-inflammatoire
			Orale	Contre le syndrome de l'intestin irritable. Le manque d'appétit et l'indigestion L'insomnie, anxiété ou stress Contre l'endormissement des bébés Contre l'hypertension
Externe			Pommade contre les piqûres d'insectes, les plaies, le prurit de l'eczéma, les irritations anales ou vulvaires	
		Inhalation	Contre le catarrhe nasal, les rhumes des foins, l'asthme et la bronchite	

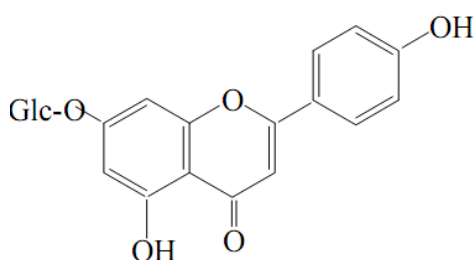
## **I-2-4- Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Matricaria* :**

Un grand nombre du genre de *Matricaria* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés. A l'exception des alcaloïdes, les recherches phytochimiques ont permis de mettre en évidence, dans le genre *Matricaria*, tous les composés caractéristiques des Compositae. Ces dernières, lors des études chimio systématiques, ont montré une grande variété de métabolites secondaires et des procédés biosynthétiques différents. On a ainsi pu mettre en évidence, au cours des études chimiques sur les Compositae, différents types de composés chimiques :

- Coumarines
- Flavonoïdes
- Terpènes
- Hétérosides
- Sesquiterpènes lactones.

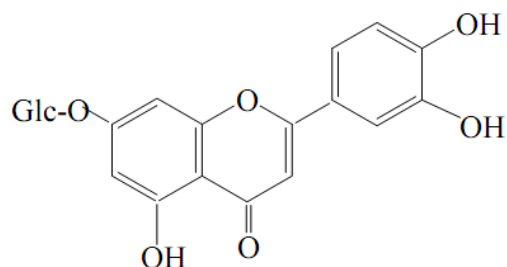
### **I-2-4-1-Les flavonoïdes [2]**

Les composés flavoniques sont des substances naturelles très répandues dans la famille des compositae où beaucoup de travaux ont été réalisés chez le genre *Matricaria*. On trouve essentiellement des flavonoïdes glycosylés comme l'apigénine 7-glucoside **1** et la lutéoline 7-glucoside **2**.



**apigénine 7-glucoside**

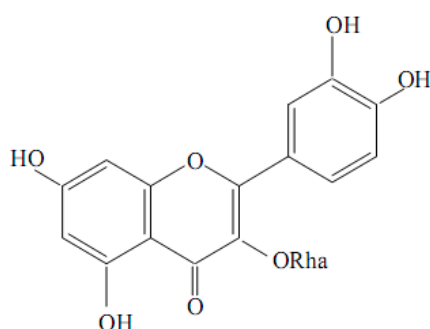
**1**



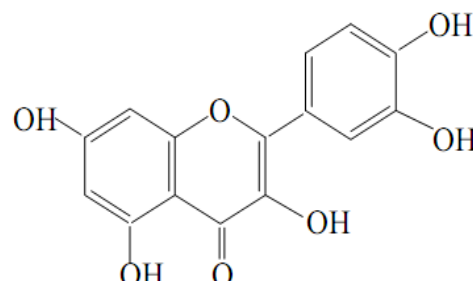
**lutéoline 7-glucoside**

**2**

L'étude chimique des espèces *M. recutita* et *M. camomille* a permis également de mettre en évidence des flavonoïdes aglycones. L'analyse spectroscopique a permis d'assigner les structures de ces composés. Il s'agit de la rutine **3** et de la quercétine **4**



**rutine**  
**3**



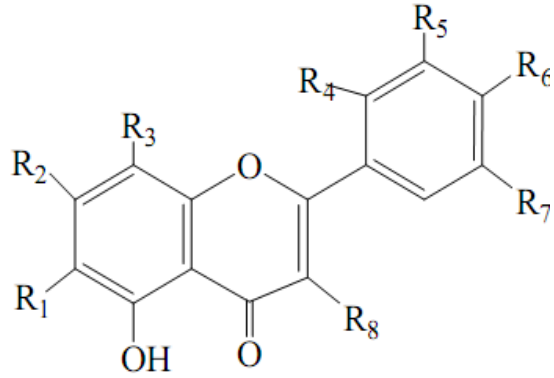
**quercétine**  
**4**

Les flavonoïdes isolés du genre *Matricaria* sont regroupés dans le tableau III, et leur structure de base avec les différentes substitutions sont mentionnées dans la page 9.

**Tableau III: Flavonoïdes isolés du genre *Matricaria***

Espèce	Origine Géographique	Flavonoïde	Structure
<i>M. Chamomilla</i>	Allemagne	- Apigénine 7-glucoside	<b>1</b>
		- patulitine	<b>5</b>
		- quercémétrine	<b>6</b>
		- luteoline 7-glucoside	<b>2</b>
		- 4,5'-dihydroxy-3',3,6,7-Tétraméthoxyflavone	<b>7</b>
		- Apigénine	<b>9</b>
		- Luteoline	<b>10</b>
		- Quercétine	<b>3</b>
		- Apigénine 7-glucoside	<b>11</b>
		- 2',6'-diacétate	
Italie		- Apigénine 7-glucoside	<b>1</b>
		- Apigénine 7-acetylglucoside	<b>8</b>
		- Apigénine 7-glucoside	<b>11</b>
		- 2',6'-diacétate	<b>9</b>
Bulgarie		Apigénine	<b>9</b>
		Apigénine 7-glucoside	<b>10</b>
		Apigénine-7-acetylglucoside	<b>8</b>
France		Apigénine	<b>9</b>
République Tchèque		Apigénine	<b>9</b>

	Yougoslavie	Apigénine	9
		Apigénine-7-glucoside	1
	Turquie	Apigénine	9
		Luteoline	11
		Apigénine-7-glucoside	1
		Kaempferol-3- glucoside	12
		Lutéoline-7- glucoside	2
	Yougoslavie	Apigénine-7acetylglucoside	8
		Apigénine7- glucoside 2',6'-diacétate	11
	Roumanie	Rutine	3
Apigénine		9	
Apigénine-7glucoside		1	
<i>M. discordea</i>	Ex. URSS	Lutéoline 7-glucoside	2
		Lutéoline	10
<i>M. flos</i>	Allemagne	Jacéidine	13
		Chrysosephenol D	14
		Eupatolitine	15
		Spinacétine	16
		Auxillarine	17
		Eupatiline	18
<i>M.inodora</i>	France	Lutéoline-7-glucoside	2
<i>M. Matricaroïde</i>	Hongrie	Quercémétrine	6
<i>M. ricutita</i>	Bulgarie	Quercétagétine	19
		Apigénine7-glucoside	1
		Lutéoline7-glucoside	2
		Hypéroside	20
		Rutine	3
		Apigénine	9
	Allemagne	Apigénine 8-B-O-(4''O-acétyl) glucoside	21
		Apigénine 7-glucoside	1
Apigénine		9	
	Apigénine 7- glucoside	1	
	Slovaquie	Apigénine	9



Structure des flavonoïdes cités dans le tableau III

Flavonoïde	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
5	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	OH	H	OH
6	H	GLc	H	H		OH	OH	OH
7	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
8	H	2',6'acetate GLc	H	H	H	OH	H	H
9	H	OH	H	H	H	OH	H	H
10	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
11	H	O-(diacétyl)- Glc	H	H	H	OH	H	H
12	H	OH	H	H	H	OH	H	OGlc
13	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>
14	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>
15	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	H	H	H
16	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H
17	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>
18	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	H	H	H	OH	H
19	OH	OH	H	H	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>
20	OH	H	H	H	OH	OH	H	O-GLc
21	OH	H	H	H	H	OH	H	(4'- acetyl) GLc



### **I-2-4-2-Intérêts pharmacologiques des Flavonoïdes isolés du genre *Matricaria* [2]**

Les flavonoïdes, connus anciennement comme toniques veineux et protecteurs capillaires (action vitaminique p utilisée comme réductrice des hémorragies), sont dotés de propriétés biologiques remarquables qui sont: anti-hypertensive, anti-allergique, anti-inflammatoire, anti-hépatotoxique et antivirale etc....Comme beaucoup de Compositeae, le genre *Matricaria* renferme des flavonoïdes qui présentent des activités physiologiques résumées dans le tableau IV.

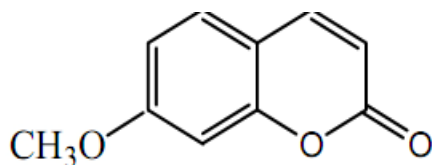
**Tableau IV: Relation entre structure et effet pharmacologique des flavonoïdes isolés du genre *Matricaria*.**

<b>Composé</b>	<b>Activité</b>
<b>Apigénine</b>	Spasmolytique, Anti-inflammatoire Inhibe l'infiltration des granulocytes Inhibe la locomotion, Anxiolytique, Sédative
<b>Luteoline 7-glycoside</b>	Spasmolytique, Traitement de la pigmentation de la peau, Antiviral
<b>Lutéoline</b>	Spasmolytique, Inhibe l'infiltration des granulocytes, Anti- inflammatoire, Traitement de la pigmentation de la Peau
<b>Patulétine</b>	Spasmolytique
<b>Quercétine</b>	Spasmolytique, Anti-inflammatoire
<b>Apigénine 7-( 6-O-acétyl) glucoside</b>	Anti-inflammatoire
<b>Apigénine 7- glucoside</b>	Spasmolytique, Anti-inflammatoire
<b>Apigénine diglycoside</b>	Spasmolytique
<b>Rutine diglycoside</b>	Spasmolytique
<b>Rutine</b>	Anti-inflammatoire
<b>Chryisine</b>	Anxiolytique, Inhibe la locomotion

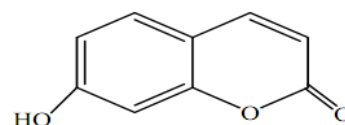
### I-2-4-3 Autres Constituants [2]

#### I-2-4-3-a- Coumarines

Les composés coumariniques rencontrés chez le genre *Matricaria* sont le plus souvent des composés simples comme c'est le cas de l'Herniarine (22) et l'umbelliférone (23).



22

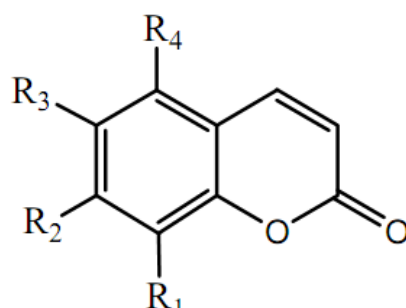


23

**Tableau V : Dérivés coumariniques isolés de quelques espèces du genre *Matricaria***

Espèce	Origine Géographique	Coumarine	Structure
<i>M. chamomilla</i>	Allemagne	Herniarine	22
		Umbelliférone	23
		Scoparone	24
	Italie	Umbelliférone	23
	France	Herniarine	22
		Umbelliférone Methyl. ether	25
Umbelliférone		23	
Scopolatine		26	
Turquie	Herniarine	22	
	Umbelliférone	23	
Bulgarie	Coumarine	27	
	Umbelliférone	23	
<i>M. discordea</i>	Ex-URSS	Umbelliférone	23
		Herniarine	22
<i>M. matricarioides</i>	Ex-URSS	Herniarine	22
	Canada	Umbelliférone	23
<i>M. pubescens</i>	Autriche	Herniarine	22
<i>M. recutita</i>	Allemagne	Herniarine	22
	Canada	Umbelliférone	23
			Herniarine

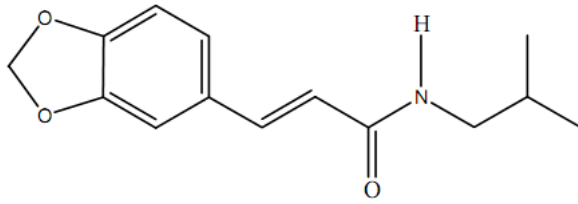
	Russie	Coumarine	27
		Isoscopolétine	28
		Scopolétine	26
		Herniarine	22
		Umbelliférone	23
		Esculétine	29
	Hongarie	Herniarine	22
	Slovaquie	Herniarine	22
	Italie	Umbelliférone	23
		Herniarine	22
	Ex-URSS	Herniarine	22
<i>M. romanae</i>	Roumanie	Umbelliférone	23
		Herniarine	22



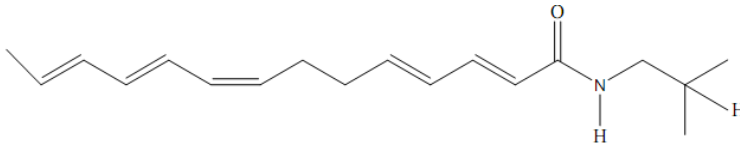
Coumarine	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
24	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
25	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
26	H	H	H	H
27	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
28	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
29	H	OH	OH	H

D'autres substances ont également été isolées de plusieurs plantes *Matricaria* :

#### **I-2-4-3-b- Amides**

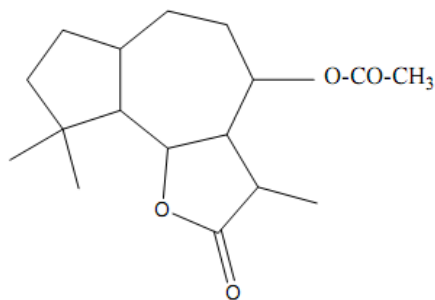


**Fagaramide**

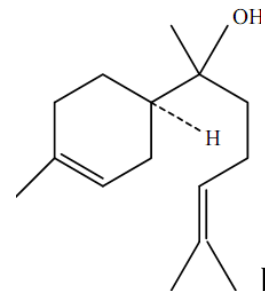


**γ-Sanshool**

#### **I-2-4-3-c- Autres Constituants**



**matricine**



**bisabol**

### **I-3-Présentation de la plante étudiée:**

*Matricaria pubescens* est une plante spontanée, elle pousse en abondance dans les régions sahariennes. Elle est très utilisée en médecine et préparation traditionnelles [7]. Ses parties utilisées sont les feuilles, les racines et les Fleur [8].

#### **I-3-1-Caractéristiques botaniques:**

*Matricaria pubescens* est une plante annuelle qui pousse juste après la pluie et ne dure pas très longtemps, elle ne dépasse guère 20 cm de haut. Elle se présente en petites touffes vert sombre aux tiges d'abord couchées puis se redressant à l'extrémité. Ses feuilles sont très découpées et plus ou moins velues et ses fleurs sont de couleur jaune vif. Son habitat

se réduit aux dépressions argilo-sableuses et les lits d'oueds. Sa période de végétation et de floraison se situe en avril-mai [9]

### **I-3-2-Répartition géographique:**

*Matricaria pubescens* est largement distribué dans tout le Sahara, il s'agit d'une espèce endémique nord-africaine [10] : Sahara Occidental, Maroc, Tunisie, Algérie et Libye [10]

### **I-3-3-Médecine traditionnelle et connaissances locales**

*Matricaria pubescens* est une plante médicinale très appréciée par les habitants des régions sahariennes. Elle est utilisée pour traiter les troubles gastro-intestinaux et du calcul biliaire, pour traiter aussi la dysménorrhée (tous les troubles des conditions liées à la menstruation) la toux et les maladies oculaires, les maladies rénales, les rhumatismes et les douleurs des maladies infectieuses et les malaises de l'abdomen, la sécheresse les maux liés à la dentition chez les enfants. Ainsi que les allergies et les morsures des scorpions.

Les tiges broyées et les feuilles sont utilisées comme un filtre pour le beurre des chèvres, ce qui donne un arôme agréable au beurre et aide à le conserver. Il est également ajouté à la soupe traditionnelle et donne à la nourriture une odeur très agréable. Elle peut être ajoutée au thé. Elle est récoltée et commercialisée à grande échelle dans les marchés. La plante possède des propriétés antiseptiques. Elle n'est pas signalée comme toxique par les nomades [7] [8].

### **I-3-4-Place dans la systématique: [7,2]**

Embranchement : Angiospermes (spermaphytes)

S/embranchement : (angiospermes)

Classe : Dicotylédones (Monocotyledones)

Sous-classe : Gamopétales (Compositae)

Ordre : Asterales

Famille : Astéracées (compositae)[8]

Genre : *Matricaria*

Espèce : *Pubescens*

Nam français : Camomille

Nom vernaculaire : Garetoufa (E, O), ouazouaza (B) [11]

Nom tamasheq : Aynasnis



**Figure 1: la plante de *Matricaria pubescens***

### **I-3-5-Composés Chimiques isolés de la plantes *Matricaria pubescens***

Des travaux réalisés sur l'espèce *Matricaria pubescens* ont permis d'isoler des métabolites secondaires divers tels que les flavonoïdes, les coumarines.....

A titre d'exemple : en Algérie [12], on peut citer l'apigénine, la lutéoline, l'apigénine 7-glycoside, la lutéoline 7-O-glycoside, la quercétine et la quercétine-3-Oglycoside qui ont été isolés de cette plante ; alors qu'en Autriche, l'isolement de la herniarine a été cité [2].

*Chapitre II*  
*Les flavonoïdes*

## II-1- Introduction

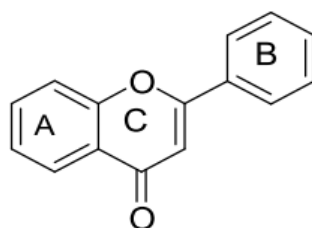
Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits, et aussi dans le miel [4].

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration [13], mais d'autres couleurs variant du blanc ivoire au jaune vif ou encore incolores peuvent être observées [6]. Ils sont assez répandus dans le règne végétal. Ils sont universels chez les angiospermes et les gymnospermes [14].

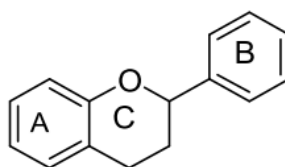
## II -2- Définition:[4]

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.



NOYAU FLAVONE

Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base.



NOYAU FLAVANE



Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) [4].

### **II -3- Nomenclature:**

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

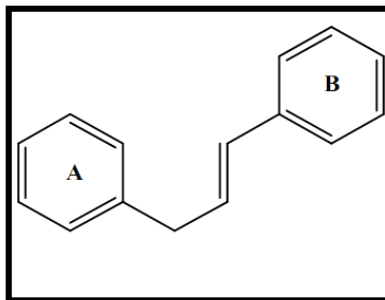
Le dernier système devient encombrant et facile d'être erroné dans les cas de polysubstitution c'est pourquoi il est rarement employé. Il y a également deux systèmes pour indiquer les substituants autour des noyaux flavane ou flavone: le premier, dans lequel des substituants précis sont placés en des positions précises des trois cycles comme par exemple 3, 5, 7,3',4'-pentahydroxyflavone à qui est attribué le nom de quercitrine ; le second, utilise la nature et la position des substituants suivies du nom du noyau en question.

Certains noms indiquent la classe du composé comme par exemple la fin « inidine» qui dénote une anthocyanidine comme la pélagonidine alors que la fin « étine » dénote un flavonol comme la quercitrine. L'évolution des noms a fait que certains glycosides ont des noms particuliers notamment certains dérivés de la quercitrine (3-rhamnosylquercétine), tels que l'isoquercitrine qui désigne la 3-glucosylquercétine ou la quercimétrine qui désigne la 7-glucosylquercétine.

Cependant, il y a peu d'uniformité dans l'appellation des flavonoïdes et beaucoup de noms sont dérivés du nom générique ou spécifique de la source comme tricine de triticum ou hypolaétine de hypoleana) [2].

## II -4- biosynthèse:

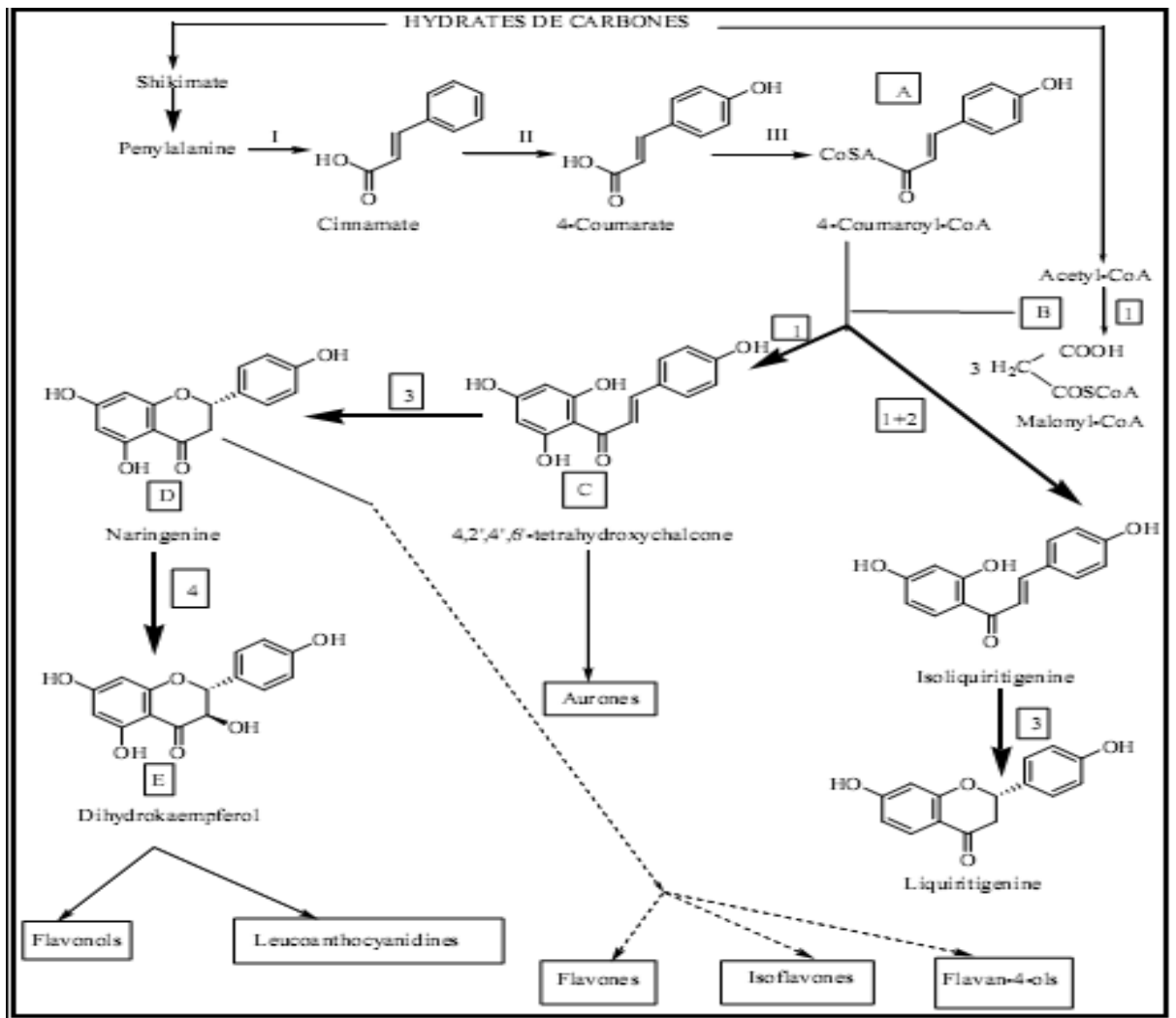
De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Figure2) [4].



**Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes**

La formation de ces molécules flavonoïques s'effectue par un intermédiaire connu: tétrahydroxychalcone à partir de laquelle se différencient plusieurs types des flavonoïdes. Le squelette moléculaire de base a une double origine : 3 molécules d'acétyl CoA (CoA = coenzyme A) pour le cycle A qui dérive de la voie acétate malonate, une molécule de p-coumaryl pour le cycle B qui dérive de la voie shikimate et aussi pour l'hétérocycle C. C'est alors à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoïdes appartenant aux diverses classes, en particuliers des pigments comme les anthocyanes et les flavonols, ou encore certains monomères de type flavonols dont la polymérisation conduira aux tannins condensés. La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosilations... [13]. Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

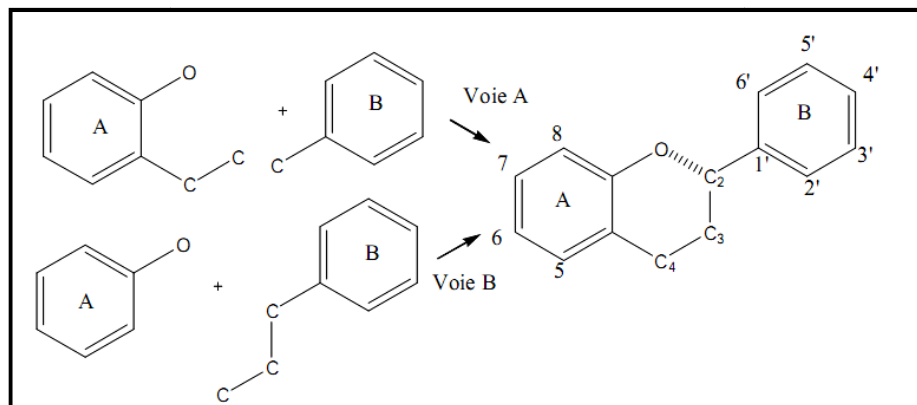
A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone [4].



**Figure 3: Mécanisme général de biosynthèse des flavonoïdes [1]**

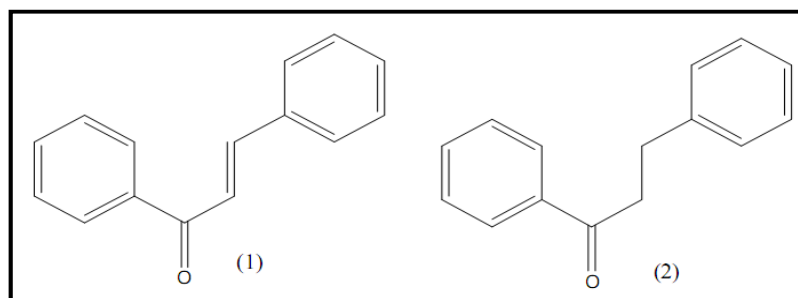
## II -5-Synthèse organique des flavonoïdes [16]

Les voies synthétiques les plus utilisées pour former le squelette C15 des flavonoïdes, commencent à partir d'unités simples, passant par l'intermédiaire de la chalcone et sont représentés dans la **figure 4**.



**Figure 4: Voies rétro synthétiques d'accès au squelette flavonoïde**

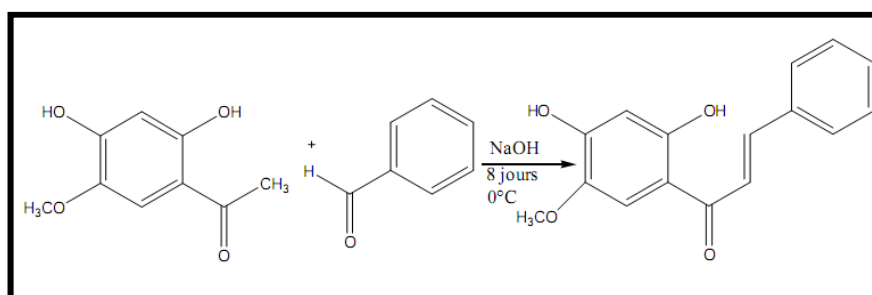
La voie A est la plus utilisée en synthèse organique, elle utilise une condensation d'un dérivé de l'acétophénone (unité C6-C2) avec un dérivé du benzaldéhyde (unité C6-C1). La voie B, qui correspond au chemin biosynthétique, consiste en l'acylation d'un phénol (unité C6) par un dérivé d'acide cinnamique (unité C6-C3). Dans tous les cas les intermédiaires clés de synthèse racémique sont des chalcones et dihydrochalcones **Figure 5** composés (1) et (2).



**Figure5: Squelettes de chalcone (1) et de dihydrochalcone (2)**

Les chalcones intermédiaires clés dans la synthèse des flavonoïdes, peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés de l'acétophénone et du benzaldéhyde substitués (catalyse acide ou basique).

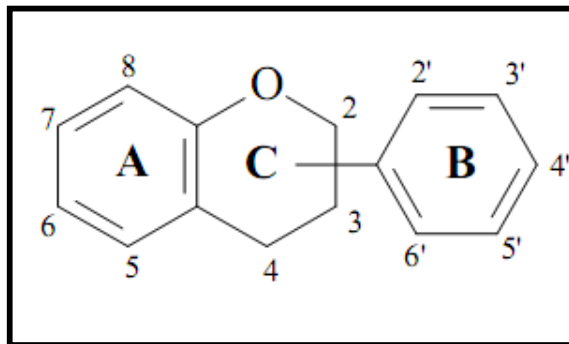
L'une des condensations, qui a été très utilisée, s'effectue en catalyse basique (**Figure6**). Elle utilise de la potasse aqueuse ou de la soude maintenue entre 0 et 20 °C durant une période de 15 à 72 heures. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des substrats ayant des groupes hydroxyles méthylés ou benzylés. Notons que de bons rendements ont été obtenus avec des substrats non protégés, mais dans ce cas les temps de réaction peuvent être supérieurs à huit jours.



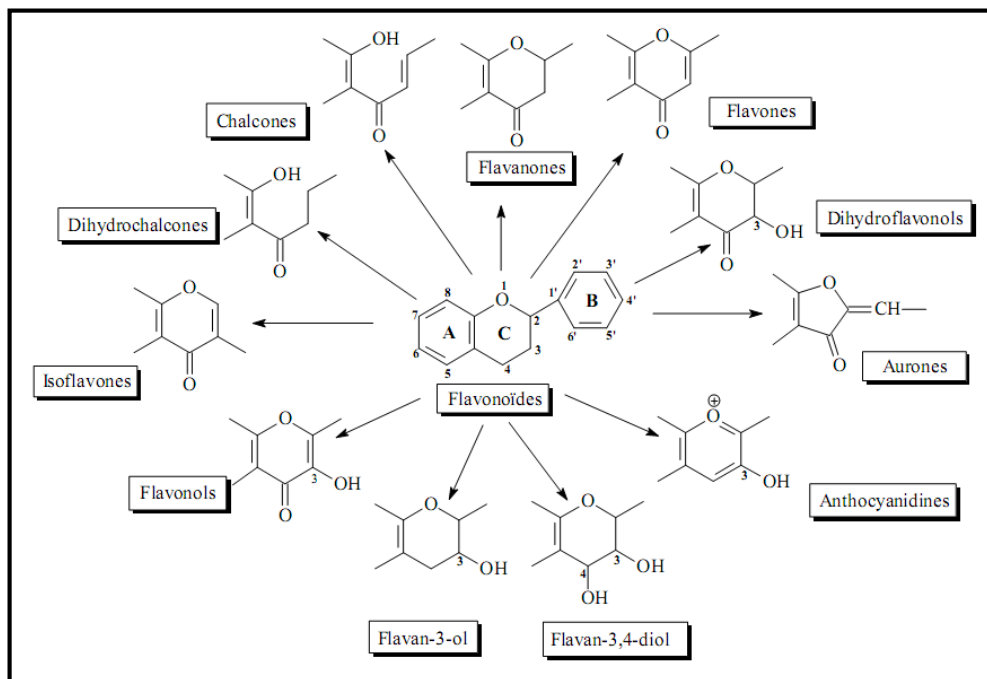
**Figure 6: Synthèse de la Flimichapparin**

## II -6- Structure chimique et substitution [16]

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C 3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substitués différents au niveau du noyau B. Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 comme le montre la **figure 7**.



**Figure 7: les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes**

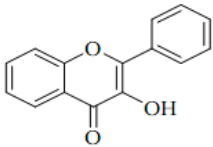
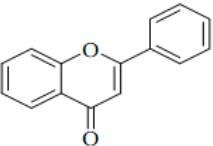
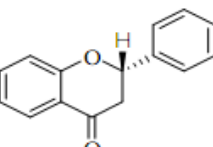
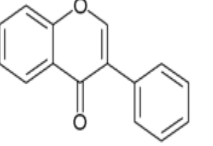
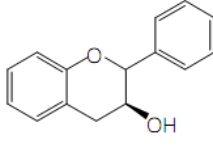
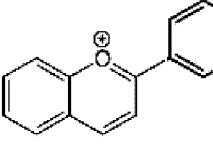


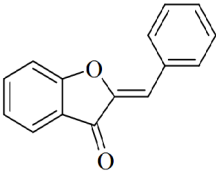
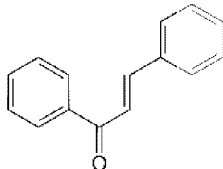
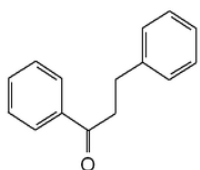
**Figure 8 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.**

## II -7- Exemples de quelques classes de flavonoïdes [17-19]

Nous présentons dans le tableau IV quelques flavonoïdes et leur source, reportés dans la littérature.

**Tableau VI: Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes**

Classe	Structure de base	Exemples de structures	Aliments
Flavonols		Kaempférol(OH: 3,5,7,4') Quercétine(OH :3,5,7,3',4')	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.
Flavones		Lutéoline (OH : 5, 7, 3',4') Apigénine(OH :5, 7, 4') Luteoline glucosides (OH : 5, 7, 3',4'-glucose) Rutine (OH : 5, 7, 3',4', rutinose :3)	Persil, céleri.
Flavanones		Naringénine(OH :5, 7,4') Eriodictyol(OH :5,7, 3', 4') Hespéridine(OH :3,5, 3', 4'-OMe, 7-rutinose)	Fruits du genre Citrus.
Isoflavones		Genistine(OH :5, 4',7-glucose) Genisteine (OH:5,7,4') Daidzin (OH :4',7-glucosse)	Graines de soja
Flavanols		(+)Catechine(OH :3,5,7,3'4') (-)Epicatechine (OH :3,5,7,3'4') Epigallocatechin gallate (OH :3,5,7,3'4', 5',3-gallate)	Thé noire, thé vert, cacao, chocolat.
Anthocyanidines		Cyanidine(OH :3,5,7,4', OMe :3,5) Delphinidine(OH :5,7,3',4',5') apigénidine(OH :5,7, 4')	Raisins, certaines variétés de céréales.

Aurones [9]		Aureusidine(OH :4,6,3',4') Sulfurétine(OH :6,3',4') Maritimétine(OH :6 ,7 , 3',4')	donne la couleur jaune pour les fleurs de certaines plantes.
Chalcones		Isoliquiritigénine(OH:4 ,2' ,4') Butéine (OH:3, 4,2',4)	synthétisée par un grand nombre de plantes.
Dihydrochalcones		Aspalathine(OH : 3,4 ,2', 4', 6':3'C-glucose) Nothofagine (OH : 4 ,2',4',6)	l'écorce des arbres de la famille des Rosaceae

## **II -8-Substitution du squelette flavonique [20]**

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthyloxylation et des glycosylations. Les composés de chaque sous-groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire.

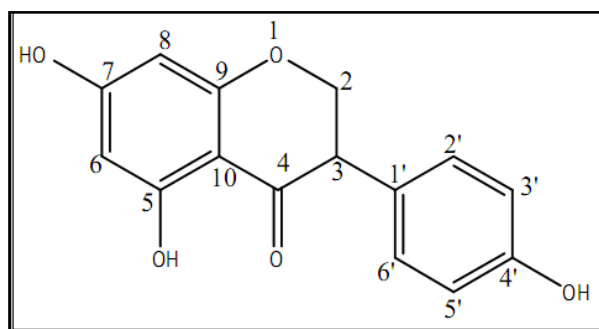
### **II -8-1- L'O- substitution:**

#### **II -8-1-1- L'hydroxylation:**

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogénèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone.

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c.à.d après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases). Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées.

Exemple :

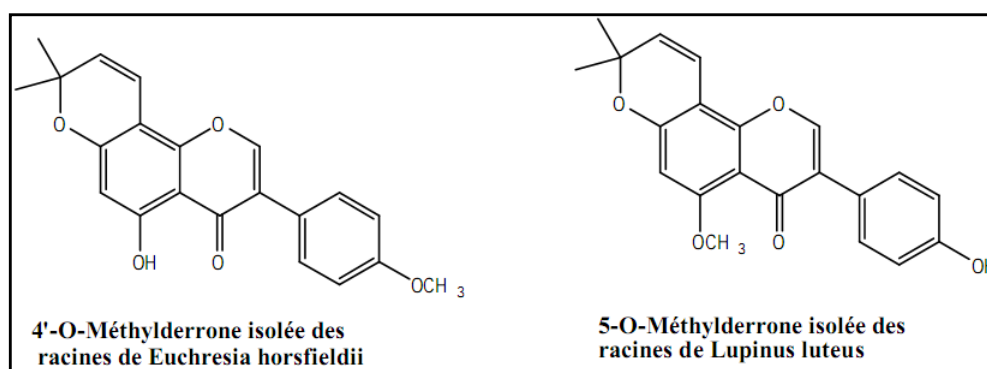


**4', 5,7-trihydroxyisoflavone (génistéine)**

## II -8-1-2-La méthylation

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransférase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone . Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols.

Cependant, très peu de travaux, dans la littérature, parlent de la relation isoflavone-méthyltransférase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri , on peut citer à titre d'exemple les deux isoflavones méthoxylés en positions 4' et 5' :



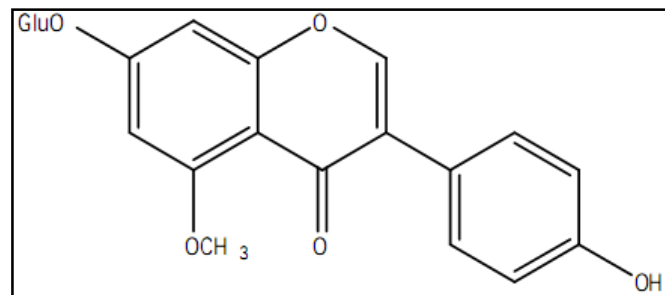


### II -8-1-3-l'O-glycosylation

La liaison s'établit entre un hydroxyle phénolique et un autre hydroxyle alcoolique d'un sucre tel que le glucose, le rhamnose, la xylose, l'arabinose, le mannose, le fructose etc....

Un deuxième sucre peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé. L'O-glycosylation se fait préférentiellement avec l'hydroxyle de la position 7 qui constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones et les flavanones et en position 3 chez les flavonols.

Exemple :



**5-O-methylgenisteine7-O-β-D-glucopyranoside**

### II -8-2- La C- substitution

#### II -8-2-1- La C-méthylation

Le méthyle est lié au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone, cette liaison est rencontrée en position 6 ou en position 8, ou encore en positions C-6 et C- 8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en positions 6 et /ou 8 est toujours inconnue.

#### II -8-2-2- La C- glycosylation

Le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone- carbone la liaison se fait entre le carbone du sucre et celui en positions 6 ou 8 de la génine qui est le plus souvent une isoflavone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide.

## **II -9- Propriétés biologiques**

### **II -9-1-Intérêt vis-à-vis des plantes**

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction, de la pathogenèse et de la symbiose. Les flavonoïdes végétaux sont impliqués dans le mécanisme d'intervention contre l'infection par des micro-organismes ou l'attaque par les herbivores. Les flavonoïdes sont également impliqués dans la production de nodosités des racines comme un système de fixation de l'azote après l'infection par la bactérie *Rhizobium* dans une variété de plantes légumineuses. Ils sont des sources de pigments pour la coloration des composés de fleurs et jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes.

### **II -9-2-Intérêt pharmacologique**

Les flavonoïdes sont connus pour de remarquables activités pharmaco-biologiques. De nombreux travaux semblent indiquer qu'ils possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-VIH, antitumorales (spécialement lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec d'autres agents chimiothérapeutiques), antiviraux, antibactériens et antiallergiques. Parmi les flavonoïdes, on peut citer une importance alimentaire majeure qui est observée dans le cas des flavonols. Plusieurs études ont indiqué qu'une consommation élevée est associée au flavonols, réduit par certaines maladies graves telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires. Ceci a conduit à la conviction qu'un régime alimentaire riche en fruits et légumes dont largement les flavonols se produisent, contribue à une bonne santé. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels.

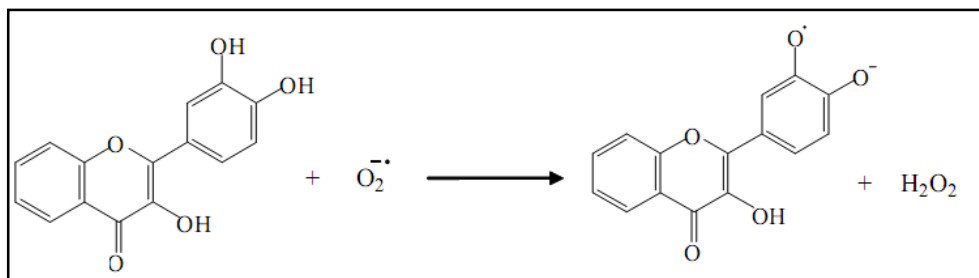
### II -9-3- Activité antioxydante des flavonoïdes:

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à :

- leur capacité de piéger directement les radicaux libres.
- de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives.
- d'inhiber quelques enzymes en particulier oxydases.
- d'activer les enzymes antioxydantes et de réduire les radicaux tocophéryles.

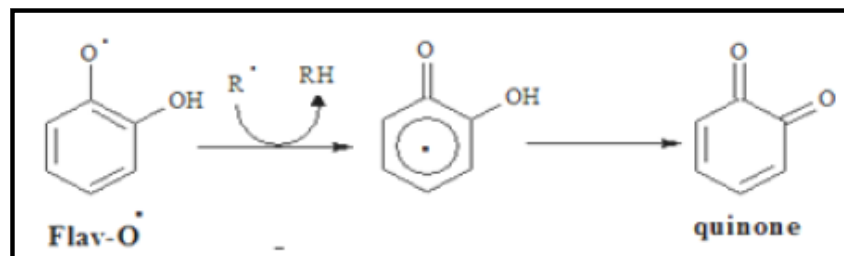
### II -9-4- Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ( $R^\bullet$ ) comme les peroxyde, le radical alcoyle et le  $OH^\bullet$  par transfert d'hydrogène [21].



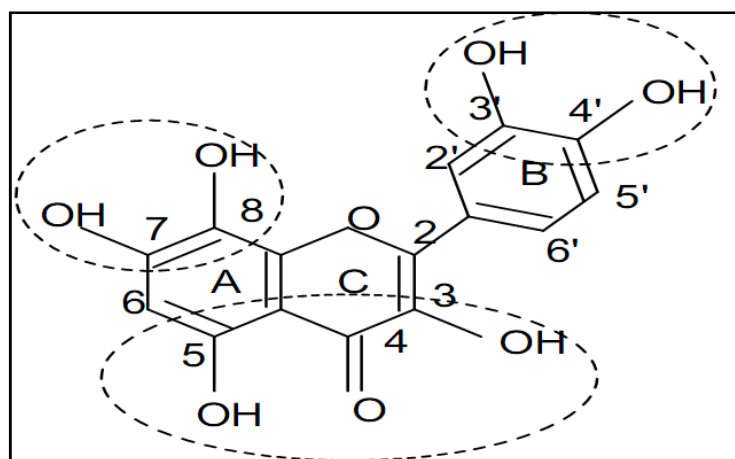
**Figure 9: Réaction des flavonoïdes avec les EOR**

Le radical aroxyde résultant ( $Flav-O^\bullet$ ) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.



De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres. Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2=C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2=C3 augmente également la capacité radicale scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à la réduction de l'activité anti-oxydante).

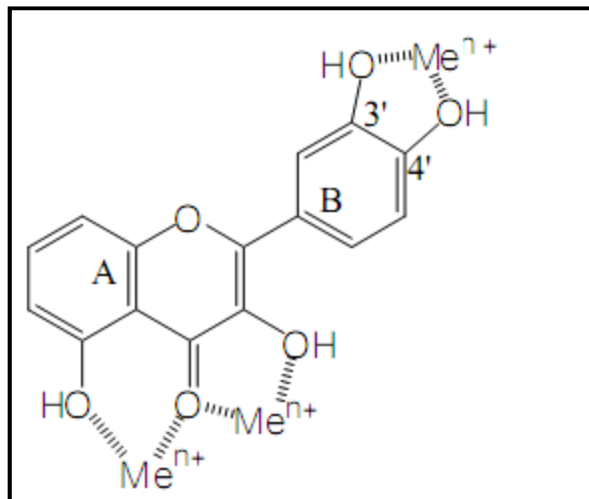


**Figure 10 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes**

## II -9-5-Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour le superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène. Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques. Les études menées par Van Acker et al. sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques (**Figure 11**) :

- (i) un noyau catéchol sur le cycle B.
- (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C [16].



**Figure 11: Flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques [5].**

*Deuxième partie*  
*Partie expérimentale*

*Chapitre III*  
*Matériels et Méthodes*

### **III-1- Matériel végétal :**

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *Matricaria pubescens* récoltée en mars 2011 aux alentours de la région d'Ouargla (Algérie). Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière, afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique, ces parties sont soumises à différentes méthodes d'extraction aux solvants organiques.

### **III-2- Méthode d'Extraction:**

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenues dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction [15].

#### **III-2-1-Protocole d'extraction:**

##### **III-2-1-a- Extraction au méthanol/Eau:**

50 g de poudre végétale a été mise à macérer dans un mélange hydro alcoolique (méthanol/Eau ; 70/30 ; v/v) à chaud. Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement de solvant chaque 24 heures. Les extraits sont ensuite réunis puis filtrés sur papier filtre. Après concentration sous vide, le résidu hydro méthanolique est dilué avec de l'eau distillée.

##### **III-2-2- b-Extraction liquide-liquide:**

Cette étape se repose sur la spécificité et la polarité des solvants organiques vis-à-vis des molécules polyphénoliques séparées contenus dans le résidu obtenu.

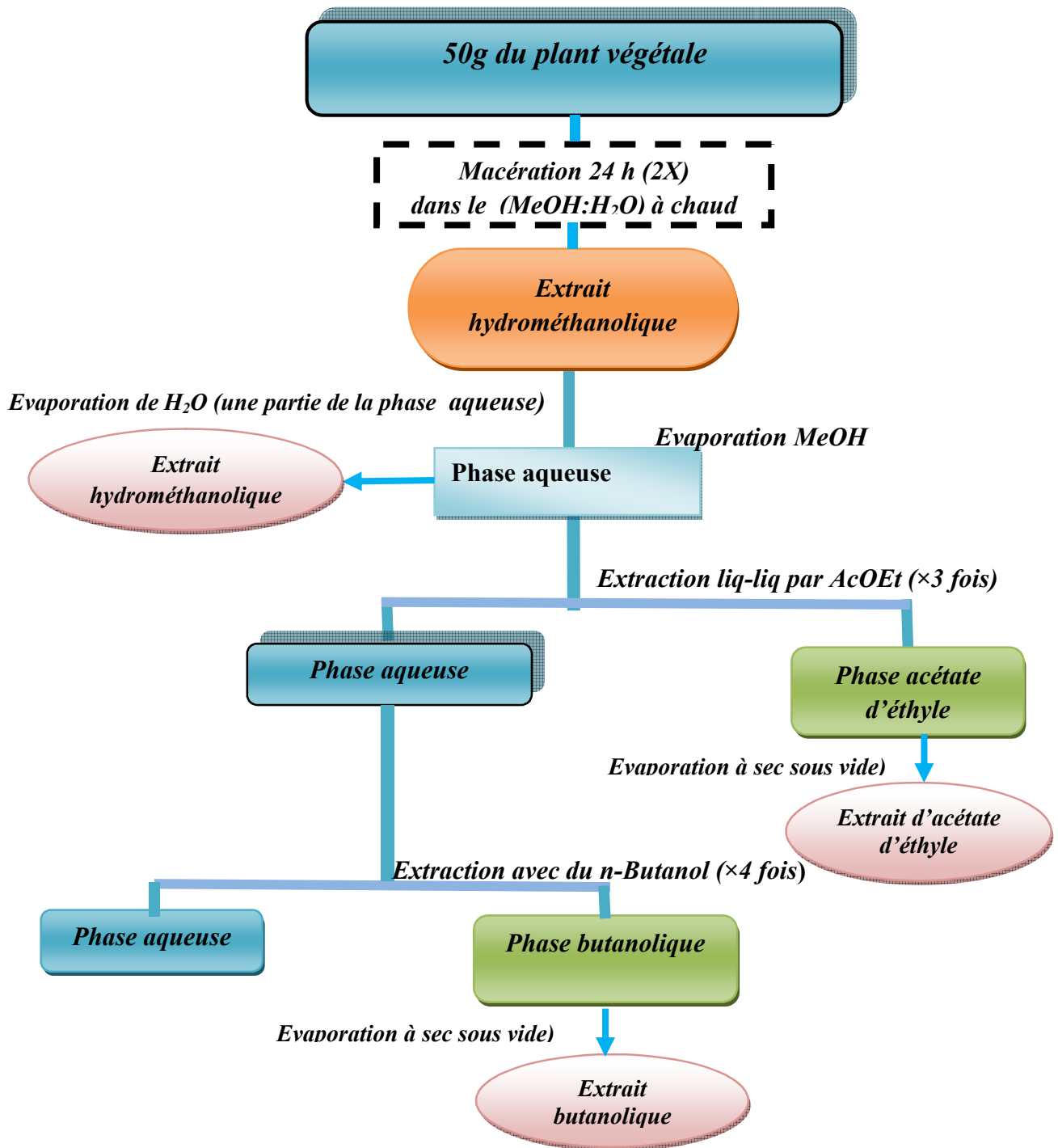
##### **III-2-1-b-1-Affrontement par l'acétate d'éthyle:**

C'est un solvant qui entraîne les mono-o-glycosides et partiellement les di-o-glycosides. Le même volume de solvant est ajouté au volume de la phase aqueuse [15].

##### **III- 2-1-b-2-Affrontement par le butanol:**

Ce solvant va entraîner essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-o-glycosides et les C-glycosides. Après évaporation à sec, les différents résidus ont été repris par du méthanol afin d'effectuer les analyses phytochimiques [15]. Le schéma suivant résume toutes les étapes citées plus haut:





**Figure 12 : Protocole d'extraction des flavonoïdes**

### **III-3-Méthodes de séparations chromatographiques:**

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et leur désorption sur la phase stationnaire, soit de leur différente solubilité dans chaque phase.

On peut classer les méthodes chromatographiques selon la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

#### **III-3-1-Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :**

##### **❖ Principe :**

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange de solvants, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et/ou flavonique de l'extrait [15].

##### **III-3-1-1-Protocole de CCM sur gel de silice :**

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de silice 60.

Phases mobiles :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / MeOH à différents pourcentages

Extraits : phase acétate d'éthyle et ses fractions

La visualisation des plaques est effectuée sous une lampe UV, en utilisant deux longueurs d'onde : 365nm et 254nm et les vapeurs de  $\text{NH}_3$  et/ou le réactif : vanilline sulfurique.

##### **III-3-1-2-Protocole de CCM sur gel de polyamide :**

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de polyamide SC6

Phases mobiles:  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MEC}/\text{HCOOH}$  - Toluène/ MEC/ MeOH

Extraits : phase acétate d'éthyle et ses fractions

La visualisation des plaques est effectuée sous la lampe UV, aux deux Longueurs d'onde : 365nm et 254nm et les vapeurs de  $\text{NH}_3$ .

### **III-3-1-3-Protocole de CCM sur gel de cellulose :**

*Phase stationnaire* : plaque analytiques en verre de gel de cellulose.

***Phase mobile:***

- (BAW): n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O
- l'acide acétique/eau distillée : AcOH /H<sub>2</sub>O

La visualisation des plaques est effectuée par les mêmes méthodes précédentes.

### **III-3-1-4-Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative :**

La chromatographie sur couche mince préparative (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre (20x20 cm) ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu. En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique est très utile car la transposition à partir de CCM analytique vers des techniques spectroscopiques est facile à réaliser.

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

#### **❖ *Protocole***

La fraction est déposée sous forme de bande fine sur la plaque, qui sera placée par la suite dans une cuve muni d'un support, contenant la phase mobile. Le système de solvants utilisé est choisi après plusieurs essais.

Après le développement et le séchage du chromatogramme, les bandes séparées et homogènes sont marquées et délimitées dans une chambre noire sous la lumière UV, suivie d'une révélation chimique en utilisant les vapeurs de NH<sub>3</sub> et par la suite un autre examen du chromatogramme sous la lumière UV à 254 et 366 nm pour noter les changements de couleurs avant et après.

Les bandes grattées constituées de produits et de la phase stationnaire sont lavés par différents solvants en gradient de polarité :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, MeOH et puis l'acétone pour solubiliser le produit séparé, qui est destiné à d'autres analyses.

### **III-3-2-Chromatographie sur papier (CP):**

#### **IV-3-2-1-La chromatographie sur papier Wathman analytique:**

##### **❖ *Principe***

Cette technique de séparation repose sur le phénomène de partage des constituants d'un extrait entre la phase stationnaire et la phase mobile. Elle utilise une phase stationnaire constituée par l'eau elle-même absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. La phase mobile est le plus souvent un mélange très polaire de solvants organiques et de l'eau, qui entraîne les molécules séparées avec des vitesses différentes, selon leur degré d'affinité vis-à-vis des deux phases.

Elle est généralement appliquée pour la séparation et parfois la purification des produits en faible quantité, soit en mode monodimensionnel ou bidimensionnel.

##### **❖ *Protocole***

Afin de réaliser l'élution par cette méthode en deux dimensions, chaque extrait ou fraction est déposé sur un coin d'une feuille de papier wathman N°1, préalablement saturée avec de l'eau puis séchée. Les systèmes de solvant utilisés après plusieurs essais sont:

- Pour la première dimension (BAW): n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O
- Pour la deuxième dimension: l'acide acétique/eau distillée.

Après le développement et le séchage du chromatogramme, les taches homogènes sont marquées et délimitées dans une chambre sous la lumière UV à 254 et 366 nm, cette opération est répétée après chaque élution, et à la fin une révélation chimique aux vapeurs de  $\text{NH}_3$  puis sous la lumière UV, on note les changements de couleurs observés.

### **III-3-2-2-La chromatographie sur papier Wathman préparative:**

#### **❖ Principe :**

Cette technique se repose sur le même principe que la précédente quoique le papier wathman utilisé est plus épais. Elle est employée pour séparer les fractions les plus simples.

#### **❖ Protocole :**

La fraction est déposée sous forme de bande fine sur le papier, qui sera placée par la suite dans une cuve muni d'un support, contenant la phase mobile. Le système de solvants utilisé est choisi après plusieurs essais.

Après le développement et le séchage du chromatogramme, les bandes séparées sont marquées et délimitées dans une chambre sous la lumière UV, suivie d'une révélation chimique (vapeurs de NH<sub>3</sub>) puis encore sous la lumière UV à 254 et 366 nm pour noter les changements de couleurs. Ces bandes sont découpées et plongées dans du méthanol pour solubiliser le produit séparé, qui est destiné pour d'autres analyses.

### **III-3-3-Rapport frontal (Rf):**

Les indications que peuvent apporté ce facteur constitue une donnée importante pour tout phytochimiste. En effet, alors que la fluorescence permet de distinguer une flavone d'un flavonol, les valeurs des Rf effectués sur des systèmes chromatographiques spécifiques ou conventionnels peuvent si elles sont bien utilisées, apporter beaucoup d'indications. Ce dernier point permet effectivement de classer les composés à analyser selon la nature des substituant présents sur ces squelettes.

La valeur de Rf est définie comme suit :

$$= \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

### **III-3-4-Chromatographie sur colonne sur gel de silice:**

#### **❖ Principe:**

Cette technique a été réalisée en 1906 par le botaniste Mikhail Tswelt, et jusqu'à nos jours elle est appliquée dans nos laboratoires [15].

Cette technique repose sur le phénomène d'absorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits apolaires sont élués les premiers.

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

**La phase stationnaire:** C'est le support solide, qui est la colonne contenant une quantité calculée de gel silice préparée sous forme de bouillie dans le moins polaire des solvants utilisés.

**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.

#### **❖ Protocole :**

Après dissolution de l'extrait obtenu par l'acétate d'éthyle dans le méthanol, on lui a additionné une quantité de gel silice, une évaporation à sec de ce mélange conduit à l'obtention d'une poudre qui est introduite délicatement dans la colonne, déjà préparée et stabilisée. Cet extrait est fractionné avec le gradient (dichloromthane/méthanol). A chaque fois des fractions de 50 ml sont recueillies.

Les fractions collectées sont soumises au contrôle chromatographique sur couche mince ou bien par CP, puis révélées par la lampe UV à 254 et à 365 nm, les vapeurs de NH<sub>3</sub> et/ou la vanilline sulfurique, ce qui nous a permis de rassembler les fractions présentant des similitudes.

Le tableau suivant indique le nombre de fractions collectées, et leurs systèmes d'éluion.

**Tableau VII : Le système d'éluion et le nombre de fractions collectées.**

N° de la fraction	% Dichlorométhane	% Méthanol
1	100	0
2	100	0
3	100	0
4	100	0
5	100	0
6	100	0
7	100	0
8	100	0
9	100	0
10	100	0
1	97	3
2	97	3
3	97	3
4	97	3
5	97	3
6	97	3
7	97	3
8	97	3
9	97	3
10	97	3
1	94	6
2	94	6
3	94	6
4	94	6
5	94	6
6	94	6
7	94	6
8	94	6
9	94	6
10	94	6
1	90	10
2	90	10
3	90	10
4	90	10
5	90	10
6	90	10
7	90	10
8	90	10
9	90	10
10	90	10
1	80	20
2	80	20
3	80	20
4	80	20
5	80	20
6	80	20
7	80	20
8	80	20

### **III- 4-techniques d'identification structurale:**

#### **III-4-1-La spectrophotométrie UV-visible**

La spectrophotométrie UV-Vis est une des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la structure chimique, les propriétés physico-structurales, et les caractéristiques optiques de divers types de composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque chromophore absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les fonctions chimiques dans les molécules à différentes conditions opératoires en se basant sur des témoins et des bases de données de la littérature.

##### **❖ Principe :**

La spectrophotométrie est une méthode quantitative et aussi qualitative, sensible, elle permet d'analyser les échantillons à faible concentration. Les spectres sont caractéristiques aux molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions.

Le spectre UV/vis. des composés flavonoïques solubilisés dans le méthanol présente deux bandes ; qui se situent respectivement entre 320 nm – 380 nm correspondant au cycle B et 240 nm – 270 nm correspondant au cycle A. Ce spectre est susceptible d'être modifié en présence des réactifs spécifiques, dont les changements du spectre apportent des indications sur la position des substitutions (groupements hydroxyles) sur la molécule [7,22].

#### **III-4-2- La spectrophotométrie IR**

La spectrophotométrie infrarouge est une technique qui permet d'identifier la structure des composés des liquides, des solides, des gaz, des poudres, des fibres, des films ou des surfaces. Elle s'intéresse à la caractérisation des groupements fonctionnels présents dans une molécule. L'analyse du faisceau infrarouge permet de détecter un certain nombre de bandes d'absorption qui correspondent aux modes de vibrations caractéristiques des divers groupements contenus dans les substances analysés. Le spectre infrarouge constitué par l'ensemble de ces bandes représente alors l'empreinte digitale de la molécule.



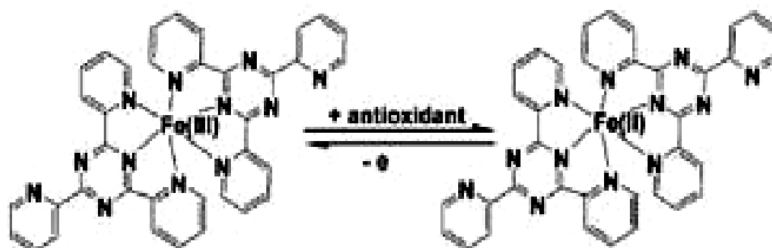
### III-5- Activité antioxydante [22]

L'activité antioxydante consiste en l'inhibition de réactions en chaîne de production de radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Cette propriété se retrouve souvent dans les familles polyphénoliques. Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi être destructrices : les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger. D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement.

L'évaluation de cette activité peut être réalisée selon différents protocoles tels par piégeage de radicaux comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) ou les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), ou encore les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle)[22]

#### ❖ *Principe de la méthode FRAP*

A faible pH, la réduction du fer tripyridyl triazines (Fe III TPTZ) complexe en forme ferreux (couleur bleu intense) peut être contrôlé par la mesure de la variation de l'absorption à 593 nm La réaction est non spécifique.



**Figure 13 : Réduction du Fe(III) -TPTZ en Fe(II) -TPTZ.**

❖ **Protocole**

- ✓ Une solution fraîche du réactif FRAP est préparée en mélangeant 10 ml de la solution du TPTZ dans une solution de HCl avec 10 ml du FeCl<sub>3</sub> et 100 ml de la solution tampon (d'acétate de Sodium / acide acétique) à un pH acide au moment de l'utilisation.
- ✓ 150 µl d'extrait, ou une solution de l'acide ascorbique (avec dilutions appropriées) en tant qu'antioxydant étalon, ajouté à 2850 µl du réactif FRAP, le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 minutes à l'obscurité.
- ✓ Le méthanol est utilisé à la place de l'antioxydant pour préparer le blanc de la courbe d'étalonnage.
- ✓ Les lectures de la densité optique sont faites à 593 nm,
- ✓ Toutes les mesures sont répétées 2 ou 3 fois [23].

*Chapitre IV*  
*Résultats et discussion*

#### **IV-1-Extraction de flavonoïdes :**

Les parties aériennes de la plante *Matricaria pubescens* ont été soumises à une macération dans un mélange hydro-alcoolique chaud; après évaporation de l'alcool, une extraction liquide- liquide est faite pour la phase aqueuse avec deux solvants l'acétate d'éthyle et le butanol puis après l'évaporation à sec, les extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur avant d'être analysés. L'histogramme ci-dessous représente les couleurs et les rendements de chaque extrait phénolique obtenu :

**Tableau VIII : Couleurs et rendements des extraits obtenus**

<b>Les extraits</b>	<b>Couleur de l'extrait</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Acétate d'éthyle</b>	<b>Marron plu claire</b>	<b>2.83</b>
<b>Butanol</b>	<b>Marron foncé</b>	<b>2.83</b>
<b>Extrait hydrométhanolique</b>	<b>Marron claire</b>	<b>2</b>

#### **IV-2-Diagnostic par CCM analytique**

Cette technique nous donne une indication sur le contenu en polyphénols et en particulier en flavonoïdes des extraits analysés, et procure les informations nécessaires pour la poursuite des autres analyses préparatives.

Les spots sont visualisés sous les longueurs d'onde 254 nm puis 365 nm, cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes que la première longueur d'onde. Comme il existe une relation entre la fluorescence et la nature ainsi que les substitutions du composé flavonique chromatographié, nous résumons les résultats dans le tableau IX ci-dessous:

**Tableau IX: Relation entre structure et couleur de flavonoïdes [5, 14,24].**

<b>Couleur de tache</b>	<b>Type de flavonoïde</b>
<b>Brun</b>	3-OH absent ou 3-substitué
<b>Violet</b>	Flavone 5-OH et 4-OH Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH Flavone 6 ou 8 OH Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanones.
<b>Bleu clair</b>	Flavone sans 5-OH libre Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
<b>Jaune terne, jaune, fluorescence orangée</b>	Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
<b>Jaune vert brillant</b>	5-OH libre ou 5-OH substitué
<b>Jaune fluorescent</b>	avec 3-OH libre Aurone, chalcone, flavanone.
<b>Jaune pâle</b>	Dihydroflavonol

Aussi la valeur du R<sub>f</sub> (facteur de rétention) permet d'avoir une idée sur le flavonoïde ainsi que la nature de ses substituants. En effet, on peut différencier les aglycones des hétérosides. Il faut cependant signaler que les valeurs de R<sub>f</sub> dépendent des conditions expérimentales telles que : la température, la nature du solvant, la concentration de l'échantillon et la nature de la matière. Le tableau X illustre cette relation structure – R<sub>f</sub>.

**Tableau X: Relation entre le Rf et les structures des flavonoïdes [4,5, 6,14].**

Structure des flavonoïdes	Rf
Augmentation de nombre des groupements -OH	Diminution de Rf dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements -CH <sub>3</sub>	Croissement de Rf dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements osidiques	La valeur de Rf diminue dans les systèmes organiques et croit dans les systèmes aqueux

**Tableau XI : Principaux tests permettant la détection des composés flavoniques[1,22]**

La nature de l'aglycone	Coloration en lumière visible	Coloration	
		UV	UV+NH <sub>3</sub>
Anthocyanidine	Rouge		
Flavane			
flavone	Jaune pale	Brun-noir	Jaune brillant
Flavonol	Jaune pale	Jaune brillant	Jaune brillant
Isoflavone		Pourpre pale	Pourpre pale
Flavanone			Jaune pale
Aurone	Jaune brillant	Jaune brillant	Rouge brillant
Chalcone	Jaune	Brun-noir	Rouge foncé

### IV-3-Etude de l'extrait brut par différentes méthodes chromatographiques

#### IV-3-1-Chromatographie sur couche mince CCM:

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur l'extrait brut de la phase acétate d'éthyle en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice. La meilleure séparation a été obtenue avec le système: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH confirmant également leur richesse en composés phénoliques en montrant des spots de couleur jaunes, bleus et noir-violetes. Par la suite les chromatogrammes sont révélés chimiquement. Les résultats du changement de couleur soit après NH<sub>3</sub> seulement ou après visualisation par la lampe UV sont résumés sur le tableau XI.

**Tableau XII: fluorescence et Rf des taches sur CCM d'extrait brut**

<i>Phase mobile CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH</i>	<i>UV</i>		<i>UV + NH<sub>3</sub></i>		<i>vanilline sulfurique</i>	
	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>
<i>86/14</i>			<i>Marron</i>	<i>0.97</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.95</i>
	<i>Violet</i>	<i>0.83</i>	<i>Violet</i>	<i>0.83</i>	<i>Rose</i>	<i>0.78</i>
			<i>Marron</i>	<i>0.51</i>	<i>bleu</i>	<i>0.67</i>
	<i>jaune</i>	<i>0.27</i>	<i>jaune</i>	<i>0.27</i>	<i>Marron</i>	<i>0.52</i>
		<i>marron</i>	<i>0.16</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.36</i>	
				<i>Orange</i>	<i>0.25</i>	
				<i>Bleu</i>	<i>0.20</i>	
<i>90/10</i>	<i>Marron</i>	<i>0.95</i>	<i>Marron</i>	<i>0.95</i>	<i>Marron</i>	<i>0.97</i>
	<i>Violet</i>	<i>0.46</i>	<i>jaune</i>	<i>0.91</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.86</i>
	<i>jaune</i>	<i>0.30</i>	<i>jaune</i>	<i>0.88</i>	<i>Rose</i>	<i>0.80</i>
			<i>Violet</i>	<i>0.48</i>	<i>Marron</i>	<i>0.47</i>
			<i>Jaune</i>	<i>0.315</i>	<i>Rose</i>	<i>0.39</i>
			<i>Marron</i>	<i>0.26</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.20</i>

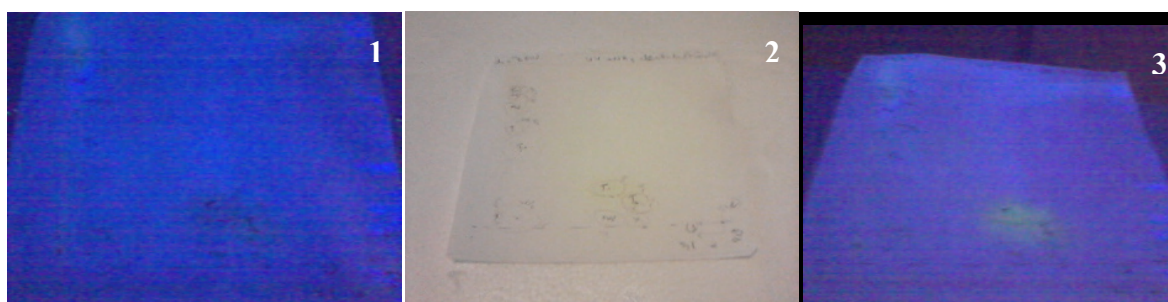
#### IV-3-2-Chromatographie sur papier bidimensionnelle:

Les conditions opératoires sont :

- Pour la première dimension : BAW
- Pour la deuxième dimension: AcOH 15 %.
- Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>

**Tableau XIII: fluorescence et Rf des tâches sur CP d'extrait brut**

<i>La 1<sup>ère</sup> dimension</i>		<i>La 2<sup>ème</sup> dimension</i>			
<i>UV</i>		<i>UV</i>		<i>NH<sub>3</sub> +UV</i>	
<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>
<i>Jaune</i>	<i>0.91</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.51</i>	<i>Marron verte</i>	<i>0.65</i>
				<i>Jaune</i>	<i>0.55</i>
				<i>Jaune</i>	<i>0.44</i>
<i>Violet</i>	<i>0.84</i>	<i>Violet</i>	<i>0.69</i>	<i>Marron verte</i>	<i>0.69</i>
		<i>Jaune foncée</i>	<i>0.80</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.77</i>
				<i>Marron verte</i>	<i>0.75</i>
				<i>Marron verte</i>	<i>0.04</i>
<i>Marron</i>	<i>0.46</i>	<i>Marron</i>	<i>0.18</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.18</i>
<i>Jaune</i>	<i>0.34</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.12</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.12</i>



**Figure 14: Chromatogrammes (CP) de l'extrait brut (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub>+UV)**

Les plaques et le papier obtenus présentent une bonne migration ; par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques. Les taches sont bien distinctes et montrent une richesse considérable de l'extrait analysé en substances flavonoïques. Partant de leurs fluorescences et Rf, les échantillons sont riches en flavones en premier lieu qui correspondent aux tâches violettes, brunes et bleues.

Les différences des valeurs de Rf sont dues à la polarité des composés vis-à-vis du système de solvants d'éluion et la phase stationnaire. Les molécules méthylées ont un Rf plus élevé que celles glycosylées.



### **IV-3-3-Chromatographie sur colonne (CC) :**

3 g de l'extrait acétate d'éthyle sont fractionnés sous pression atmosphérique dans une colonne ouverte de gel de silice. L'élution s'est faite initialement au moyen du dichlorométhane pur, puis par augmentation de la polarité progressive par le méthanol, et finalement le méthanol pur. Des fractions de 50 ml sont collectées à l'issue de ce fractionnement, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIII.

#### **IV-3-3-1-Résultats de la séparation par colonne ouverte:**

##### *❖ Méthode de sélection des fractions à purifier:*

Toutes les fractions collectées sont évaporées et analysées par CCM de différentes phases stationnaires : gel silice, polyamide et cellulose. Celles qui contiennent plusieurs taches ne sont pas prises en considération dans ce travail, ainsi que les mono tâches dont la quantité n'est pas suffisante.

L'analyse par CCM a permis de rassembler les fractions qui ont le même aspect (la couleur, le Rf et le nombre de spots).

Le choix d'une fraction à purifier se base sur certains critères à savoir, la simplicité de sa CCM analytique et la quantité suffisante. Le tableau XIII indique le nombre de fractions collectées, et leur système d'élution.

**Tableau XIV: Résultats de séparation par CC de l'extrait acétate d'éthyle**

<i>Système de solvants d'éluion</i>	<i>Fractions recueillies</i>	<i>Composition des fractions</i>
<i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%</i>	<i>1-5</i>	<i>Graisses</i>
	<i>6-8</i>	<i>Mélange avec 1 tache majoritaire</i>
	<i>10 (A1)</i>	<i>Mélange avec 2 taches séparées</i>
<i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 97/3</i>	<i>1-2</i>	<i>Mélange avec 1 tache majoritaire</i>
	<i>3 (A2)</i>	<i>Mélange avec 3 taches majoritaires</i>
	<i>4 (A3')</i>	<i>Mélange avec 3 taches majoritaires</i>
	<i>5-6 (A3)</i>	<i>Mélange avec 3 taches majoritaires</i>
	<i>7</i>	<i>Mélange avec Mélange complexe</i>
	<i>8-10 (A4)</i>	<i>Mélange avec 1 tache majoritaire</i>
<i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 94/6</i>	<i>1-2</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>3(A5)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>4 (A6)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>5(A7)</i>	<i>Mélange séparable (IR)</i>
	<i>6-7(A8)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>8(A9)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>9-10(A10)</i>	<i>Mélange séparable</i>
<i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 90/10</i>	<i>1(A11), 2(A12)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>3(A13)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>4(A14)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>5(A15)</i>	<i>Mélange complexe</i>
	<i>6(A16)</i>	<i>Mélange complexe</i>
	<i>7(A17)</i>	<i>--</i>
	<i>8-9-10(A18)</i>	<i>Mélange séparable</i>
<i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 80/20</i>	<i>2(A19)</i>	<i>solide formée (IR, UV)</i>
	<i>3</i>	<i>--</i>
	<i>4</i>	<i>--</i>
	<i>5(A20)</i>	<i>Mélange séparable</i>
	<i>6</i>	<i>--</i>
	<i>7(A21)</i>	<i>solide (UV)</i>
	<i>8(A22)</i>	<i>Mélange séparable</i>

### **IV-3-3-2-Etude chromatographique de quelques fractions**

L'analyse de ces fractions est effectuée sur des plaques de gel silice, de cellulose et/ou le papier, la visualisation sous la lampe UV à deux longueurs d'ondes différentes 364 nm et 254 nm, plus les vapeurs de NH<sub>3</sub> et/ou la vanilline sulfurique. Les chromatogrammes obtenus ont permis de calculer les R<sub>f</sub> et distinguer les couleurs de ces fractions sous lampe UV. Les informations acquises vont être utilisées pour l'identification des molécules.

#### **IV 3-3-2-1 Chromatographie sur couche mince**

##### **IV-3-3-2-1-a-La fraction A1 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré deux taches majoritaires.

L'analyse par CCM analytique s'est faite selon les conditions suivantes:

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de gel de silice
- La phase mobile : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 %)
- Révélation: UV 254/365 nm, NH<sub>3</sub> +UV et vanilline sulfurique +chauffage 3 min à 100°C

**Tableau XV: fluorescence et R<sub>f</sub> des tâches sur CCM de la fraction A1**

<i>UV</i>	<i>UV +NH<sub>3</sub></i>	<i>R<sub>f</sub></i>
Violet	Violet	0.18
Violet	Violet	0.32

Cette fraction très simple contient deux produits bien séparés, dont la fluorescence est violette.

##### **IV-3-3-2-1-b-La fraction A2 (97/3)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 3 taches majoritaires.

L'analyse par CCM analytique s'est faite selon les conditions suivantes:

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de gel de silice
- La phase mobile : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH (98/2)
- Révélateur: UV 254/365 nm, NH<sub>3</sub> + UV et vanilline sulfurique + chauffage 3 min à 100 °C.

**Tableau XVI: fluorescence et Rf des tâches sur CCM de la fraction A2**

<i>UV</i>	<i>UV +NH<sub>3</sub></i>	<i>Révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>Rf</i>
<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	-	<i>0.28</i>
<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	-	<i>0.43</i>
-	-	<i>Rose</i>	<i>0.62</i>

Cette fraction a montré la même coloration que (A1) plus un produit rose révélé par la vanilline sulfurique ; le Rf est différent. la tache rose peut-être un flavane .

**IV-3-3-2-1-c-La fraction A3 (97/3)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 7 taches. L'analyse par CCM analytique sous les conditions suivantes nous conduit aux résultats du tableau XVI:

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de gel de silice
- La phase mobile= CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcEt/MeOH (98/2/5)
- Révélateur: UV 254/365 nm et vanilline sulfurique +chauffage 3 min à100 °C

**Tableau XVII: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A3**

<i>UV</i>	<i>révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>Rf</i>
<i>Violet</i>	<i>Rose</i>	<i>0.6</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.51</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.42</i>
<i>Jaune</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.36</i>
<i>Jaune</i>	<i>rose</i>	<i>0.3</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.23</i>

**IV-3-3-2-1-d- La fraction A7 (94/6)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 9 taches, en utilisant les conditions suivantes :

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de gel de silice
- Phase mobile: CHCl<sub>3</sub> /AcEt/MeOH/HCOOH 96/4/4/0.5)
- Révélateur: UV 254/365 nm et vanilline sulfurique +chauffage 3 min à100 °C

**Tableau XVIII: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A7**

<i>UV</i>	<i>révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>Rf</i>
<i>Bleu</i>	-	<i>0.03</i>
<i>Jaune</i>	-	<i>0.08</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.16</i>
<i>Jaune</i>	<i>Marron</i>	<i>0.21</i>
<i>Jaune</i>	-	<i>0.25</i>
<i>Violet</i>	-	<i>0.37</i>
	<i>Violet</i>	<i>0.44</i>
	<i>Jaune</i>	<i>0.61</i>
	<i>Jaune</i>	<i>0.70</i>

Cette fraction s'est montrée très riche en composés, avec une bonne séparation et apparition de nouvelles couleurs: marron, jaune et bleu.

**IV-3-3-2-1-e- La fraction A10 (94/6)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 7 taches avec le système suivant et les résultats du tableau XIX:

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de gel de silice
- La phase mobile= CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcEt/MeOHAcOH) (96/4/4/0.5)
- Révélateur: UV 254/365 nm et vanilline sulfurique +chauffage 3 min à100 °C

**Tableau XIX : fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A10**

<i>UV</i>	<i>Révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>Rf</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.06</i>
<i>Jaune</i>	-	<i>0.15</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.21</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.39</i>
<i>Violet</i>	-	<i>0.51</i>
-	<i>Rose</i>	<i>0.58</i>
<i>Violet</i>	-	<i>0.91</i>

- Une autre fraction très riche avec différentes couleurs.

#### IV-3-3-2-1-f- La fraction A11 (90/10)

##### ❖ CCM sur gel silice

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 3 taches sous les conditions suivantes :

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de Gel de silice
- Phase mobile:  $\text{CHCl}_3$  /AcEt/MeOH/HCOOH 90/10/10/0.5 %
- Révélateur: UV 254/365 nm et vanilline sulfurique + chauffage 3 min à 100 °C

**Tableau XX: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A11**

<i>UV</i>	<i>Révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>R<sub>f</sub></i>
<i>Jaune</i>	<i>- Jaune</i>	<i>0.64</i>
<i>Jaune</i>	<i>-gri</i>	<i>0.35</i>
<i>- Jaune</i>	<i>Rose+gris</i>	<i>0.25</i>

##### ❖ CCM sur gel de cellulose monodimensionnelle

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 3 taches, dans les conditions opératoires suivantes :

- Phase stationnaire: Plaque en verre de gel cellulose
- Phase mobile: BAW et AcOH
- Révélateur: UV 254/365 nm et  $\text{NH}_3$

**Tableau XXI: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A11**

<i>BAW</i>			<i>AcOH</i>		
<i>UV</i>	<i>UV+NH<sub>3</sub></i>	<i>R<sub>f</sub></i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH<sub>3</sub></i>	<i>R<sub>f</sub></i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0</i>	<i>Marron</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.03</i>
<i>Marron</i>	<i>Marron</i>	<i>0.44</i>	<i>Jaune</i>	<i>-</i>	<i>0.23</i>
<i>Violet</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.74</i>	<i>-</i>	<i>Violet</i>	<i>0.28</i>
<i>Violet</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.81</i>	<i>Marron</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.33</i>
<i>Marron</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.89</i>	<i>Violet</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.39</i>
<i>Jaune bleu</i>	<i>Jaunebleu</i>	<i>0.95</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.53</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.97</i>	<i>-</i>	<i>bleu</i>	<i>0.68</i>
			<i>Jaune</i>	<i>-</i>	<i>0.84</i>

- La phase mobile AcOH a conduit à une meilleure séparation qu'avec BAW . Notons aussi qu'à travers cette analyse nous déduisons que la fraction contient plus de composés polaires.
- La fluorescence orangée avec NH<sub>3</sub> nous fait proposer la présence d'un Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre

**IV-3-3-2-1-g-La fraction A18 (90/10)**

- ❖ *CCM sur gel de polyamide*
  - Phase stationnaire: Plaque de Gel de polyamide (support plastique)
  - Phase mobile: Tol/ MEC/MeOH 4/3/3
  - Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>.

**TableauXXII: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A18**

<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0</i>
<i>Marron</i>	<i>Jaune foncé</i>	<i>0.40</i>
<i>Marron</i>	<i>Jauneclaire</i>	<i>0.47</i>
<i>-</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0.57</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0.86</i>

- ❖ *CCM sur gel de cellulose monodimensionnelle*
  - Support Chromatographique: Plaque en verre de Gel de cellulose, 10x10 cm
  - Phase mobile: AcOH 10% et BAW
  - Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>.

**Tableau XXIII: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A18**

<i>AcOH</i>			<i>BAW</i>		
<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0</i>	<i>Marron</i>	<i>-</i>	<i>2.8</i>
<i>Marron</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.11</i>	<i>Bleu</i>	<i>Vert</i>	<i>4.7</i>
<i>marron</i>	<i>JauneOrangé</i>	<i>0.26</i>	<i>Violet noire</i>	<i>-</i>	
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0.30</i>	<i>Marron</i>	<i>jaune</i>	<i>5.7</i>
<i>-</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.41</i>	<i>Violet claire</i>	<i>Violet</i>	<i>6.4</i>
<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.50</i>	<i>Bleu</i>	<i>bleu</i>	<i>7.1</i>
<i>-</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.58</i>	<i>Jaune</i>	<i>jaune</i>	<i>7.7</i>
<i>bleu</i>	<i>Vert</i>	<i>0.69</i>			
<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.77</i>			

- La séparation par AcOH/H<sub>2</sub>O est meilleure que celle obtenue par la phase BAW ce qui implique que la fraction contient plus de produits polaires avec une variété de couleurs et donc une variété de substances.
- de nouvelles fluorescences sont apparues : l'orangé et le vert avec le (NH<sub>3</sub>+UV).

#### **IV-3-3-2-1-h-La fraction A19 (80/20)**

*CCM sur gel de polyamide :*

- Phase stationnaire: Plaque de Gel de polyamide
- Phase mobile: Toluène/ MethylEthylCétone/MeOH 4/3/3
- Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>

**Tableau XXIV: fluorescence et R<sub>f</sub> des taches sur CCM de la fraction A19**

<i>UV</i>	<i>UV+NH<sub>3</sub></i>	<i>R<sub>f</sub></i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0.26</i>
<i>Marron</i>	<i>Marron</i>	<i>0.45</i>
<i>Jaune</i>	<i>Jaune claire</i>	<i>0.50</i>
<i>Jaune</i>	<i>Marron</i>	<i>0.71</i>
<i>Jaune</i>	<i>-</i>	<i>0.85</i>

- Cette fraction très simple et bien séparée

#### **IV-3-3-2-1-i-La fraction A20 (80/20)**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré 9 taches. Avec le système suivant :

- Phase stationnaire: Plaque en aluminium de Gel de silice
- Phase mobile: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /AcOEt/MeOH/HCOOH (70/30/30/0.5)
- Révélateur: UV 254/365 nm et vanilline sulfurique +chauffage 3 min à100 °C



**Tableau XXV: fluorescence et Rf des taches sur CCM de la fraction A20**

<i>A visible</i>	<i>UV</i>	<i>UV +NH3</i>	<i>Révélation avec la vanilline sulfurique</i>	<i>Rf</i>
<i>Jaune</i>	<i>Marron</i>	<i>Marron</i>	<i>Rose</i>	<i>0.49</i>
<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.36</i>

**IV-3-3-2-2-Chromatographie sur papier bidimensionnelle**

**IV-3-3-2-2-a-La fraction A7 (94/6)**

- Phase stationnaire: papier wathman N°1
- Pour la première dimension (BAW): n-BuOH/AcOH/H2O
- Pour la deuxième dimension: l'acide acétique/eau distillée15%.

**TableauXXVI : fluorescence et Rf des taches sur CP de la fraction A7**

<i>1<sup>ère</sup> dimension</i>			<i>2<sup>ème</sup> dimension</i>		
<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.79</i>	<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0</i>
			<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.24</i>
			<i>Bleu</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.88</i>



**Figure15 : Chromatogramme (CP) de la fraction A7 (UV, NH<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>+UV)**

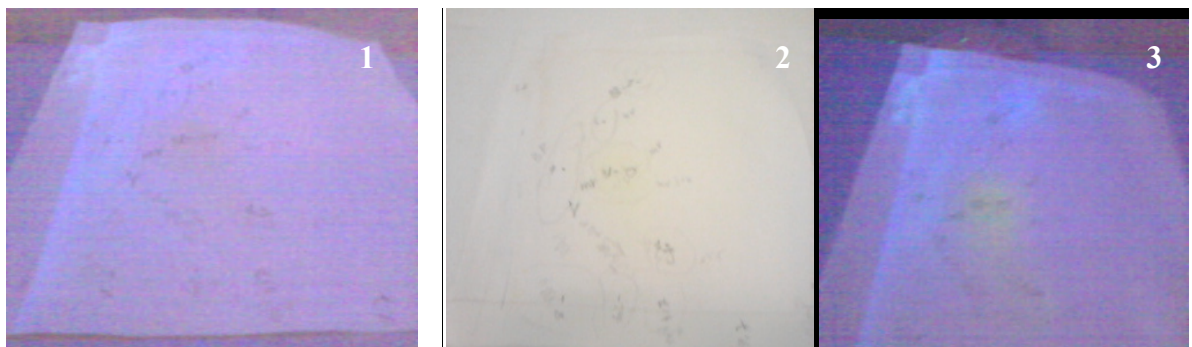
Les produits de cette fraction sont bien séparés, le produit bleu est le moins polaire. Il n'est pas élué avec la phase polaire.

**IV-3-3-2-2-b-La fraction A18 (90/10) :**

- Phase stationnaire: papier wathman N°1
- Pour la première dimension : (BAW)
- Pour la deuxième dimension: l'acide acétique/eau distillée.

**Tableau XXVII: fluorescence et Rf des taches sur CP de la fraction A18**

<i>1ere dimension</i>			<i>2<sup>eme</sup> dimension</i>		
<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>Violée</i>	<i>Violet</i>	<i>0.50</i>		<i>Jaune</i>	<i>0.10</i>
	<i>Jaune</i>	<i>0.63</i>	<i>Marron</i>	<i>Orongè</i>	<i>0.42</i>
			<i>Violée</i>	<i>Violet</i>	<i>0.61</i>
			<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.82</i>
<i>Bleu vert</i>		<i>0.82</i>	<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.41</i>



**Figure16 : Chromatogrammes (CP) de la fraction A18 (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub>+UV)**

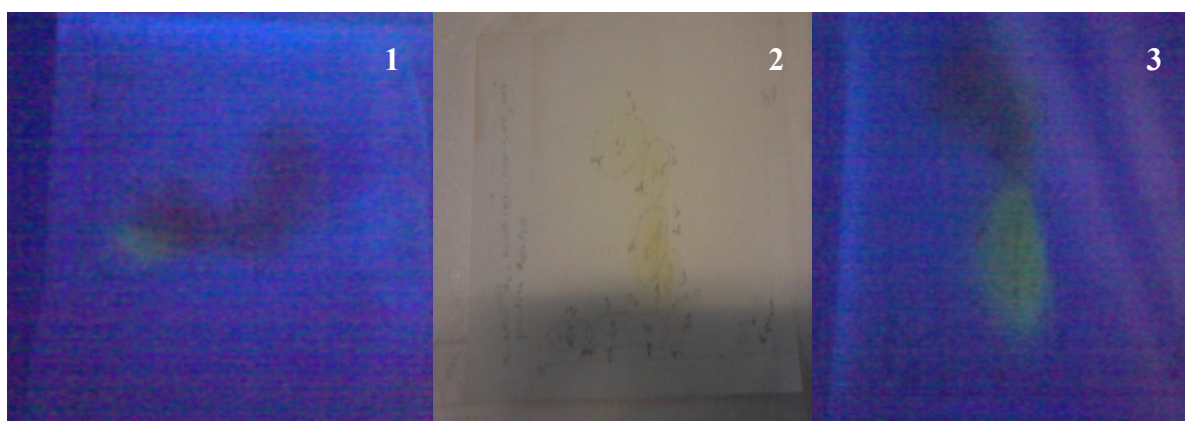
- La fraction est très riche en composés de différentes polarités.

**IV-3-3-2-2-c-La fraction A20 (80/20)**

- Phase stationnaire: papier wathman N°1
- Pour la première dimension: (BAW)
- Pour la deuxième dimension: AcOH 15%

**Tableau XXVIII: fluorescence et Rf des taches sur CP de la fraction A20**

<i>La 1<sup>ere</sup> dimension</i>		<i>La 2<sup>eme</sup> dimension</i>		
<i>Avec UV</i>		<i>Avec UV</i>	<i>Avec NH<sub>3</sub> +UV</i>	
<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>	<i>Couleur</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i>
<i>Jaune</i>	<i>0.36</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune vif</i>	<i>0.15</i>
<i>Marron</i>	<i>0.50</i>	<i>Marron</i>	<i>Jaune verte</i>	<i>0.31</i>
		<i>Marron</i>	<i>Marron</i>	<i>0.51</i>
<i>Marron</i>	<i>0.64</i>	<i>Marron</i>	<i>Marron</i>	<i>0.61</i>
<i>Bleu</i>	<i>0.84</i>			



**Figure17 : Chromatogrammes (CP) de la fraction A20 (1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub>+UV)**

○ La composition de cette fraction est très complexe pour être séparée par CP. Ainsi la mise à profit des techniques chromatographiques pour les fractions les moins complexes issues de la séparation sur colonne de gel de silice de l'extrait acétate d'éthyle, nous a permis, avec l'utilisation des plaques analytiques de gel de silice, cellulose ou polyamide et l'élution par divers systèmes de solvants organiques, de constater les couleurs les plus fréquentes qui sont apparues, à savoir :

- La fluorescence Violette qui peut-être : Flavone 5-OH et 4-OH, Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH, Flavone 6 ou 8 OH, Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, ou flavanones.
- La fluorescence Marron qui peut-être 3-OH absent ou 3-substitué
- Les fluorescences Bleu ou bleu clair qui peuvent-être : Flavone sans 5-OH libre  
Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
- Jaune terne, jaune, et l'orangé : Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre
- Les fluorescences Jaune, vert brillant ou vert, peuvent-être : 5-OH libre ou 5-OH substitué.les informations qui donnent la relation entre couleurs et structures sont résumées dans les tableaux (IX, XI)

### IV-3-3-2-3-Purification de quelques fractions

#### IV-3-3-2-3-a-Purification de la fraction A7

##### ❖ *La chromatographie préparative sur papier wathman :*

La séparation effectuée par CP préparative avec papier wathman N°3 a permis l'isolement des composés A7B1 et A7B2. Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous:

- Phase mobile: acide acétique /H<sub>2</sub>O
- Révélation: UV 254/365 nm et vapeurs NH<sub>3</sub>

**TableauXXIX : fluorescence et Rf des bandes sur CP de la fraction A7**

<i>Fraction</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>A7B1</i>	<i>Bleu</i>	<i>Jaune</i>	<i>0</i>
<i>A7B2</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.5</i>
<i>A7B3</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.66</i>
<i>A7B4</i>	<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0.84</i>
<i>A7B5</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.957</i>

##### ❖ *Analyse pour regroupement des fractions purifiées :*

- ***CCM sur gel de cellulose:***
- Phase mobile: AcOH 15%
- Révélation: UV 254/365 nm et vapeurs NH<sub>3</sub>

**TableauXXX : fluorescence et Rf des taches sur CP des produits purifie**

<i>A7B1</i>			<i>A7B2+A7B3</i>			<i>A7B4</i>		
<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>	<i>UV</i>	<i>UV+NH3</i>	<i>Rf</i>
<i>Bleu</i>	<i>Bleu</i>	<i>0</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.66</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.31</i>
			<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.31</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.66</i>
						<i>Bleu claire</i>	<i>Bleu claire</i>	<i>0.71</i>

Le produit de la fraction A7B1 est pur mais la fraction (A7B2 +A7B3) est un mélange de deux produits, alors qu'A7B4 est un mélange de trois produits



**Figure 18: Chromatogramme (CCM) sur cellulose des produits regroupés**  
**Révélés par (UV, NH<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>+UV)**

#### **IV-3-3-2-3-b-Purification de la fraction A18**

##### ***❖ Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative***

La séparation effectuée par chromatographie sur couche mince préparative a permis l'isolement des composés A18B1 et A18B2. Les conditions de séparation sont résumées ci dessous:

- Support Chromatographique: Plaque en verre de Gel de cellulose, 20 X 20 cm, épaisseur de couche 0,5 mm
- Phase mobile: AcOH/H<sub>2</sub>O
- Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>.

**TableauXXXI: fluorescence et Rf des bandes sur CCM de la fraction A18**

<i>Fraction</i>	<i>UV</i>	<i>UV+ NH<sub>3</sub></i>	<i>Rf</i>
<i>A18B1</i>	<i>Violet</i>	<i>Violée</i>	<i>0</i>
<i>A18B2</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.0625</i>
<i>A18B3</i>	<i>Sombre</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.13</i>
<i>A18B4</i>	<i>Sombre</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.23</i>
<i>A18B5</i>	<i>Sombre</i>	<i>Orangé</i>	<i>0.33</i>
<i>A18B6</i>	<i>Jaune</i>	<i>-</i>	<i>0.418</i>
<i>A18B7</i>	<i>Jaunebleu</i>	<i>-</i>	<i>0.5</i>
<i>A18B8</i>	<i>Violet</i>	<i>Violet</i>	<i>0.61</i>
<i>A18B9</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.68</i>
<i>A18B10</i>	<i>Bleu</i>	<i>Vert</i>	<i>0.75</i>
<i>A18B11</i>	<i>Sombre</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.85</i>
<i>A18B12</i>	<i>Jaune</i>	<i>Jaune</i>	<i>0.96</i>

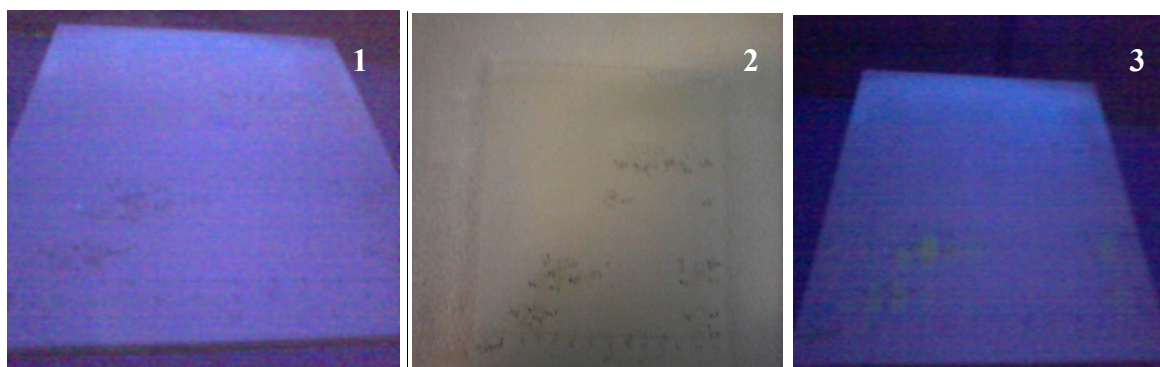
❖ ***Analyse pour le groupe des fractions purifiées par CCM sur gel de cellulose:***

- Support Chromatographique: Plaque en verre de Gel de cellulose, 10 X 10 cm.
- Phase mobile: AcOH/H<sub>2</sub>O
- Révélateur: UV 254/365 nm et NH<sub>3</sub>.



Nous avons obtenu 3 produits purs: A18B1, A18B8 et A18B9 dont les Rf sont Respectivement 0, 0.53 et 0.65 leurs fluorescences: le premier est violet, il peut-être une flavone ou un flavanol substitué et le produit A18B9 est bleu, peut-être une Flavone sans 5-OH libre et le dernier peut être un Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué.

En ce qui concerne les fractions : A18B2, A18B3, A18B4, A18B4, A18B5, A18B6, A18B7 sont des mélanges qui peuvent être séparés.



**Figure 19: Test CCM sur cellulose pour le groupe de produits séparés de A18**

**(1) UV, (2) NH<sub>3</sub>, (3) (NH<sub>3</sub>+UV)**



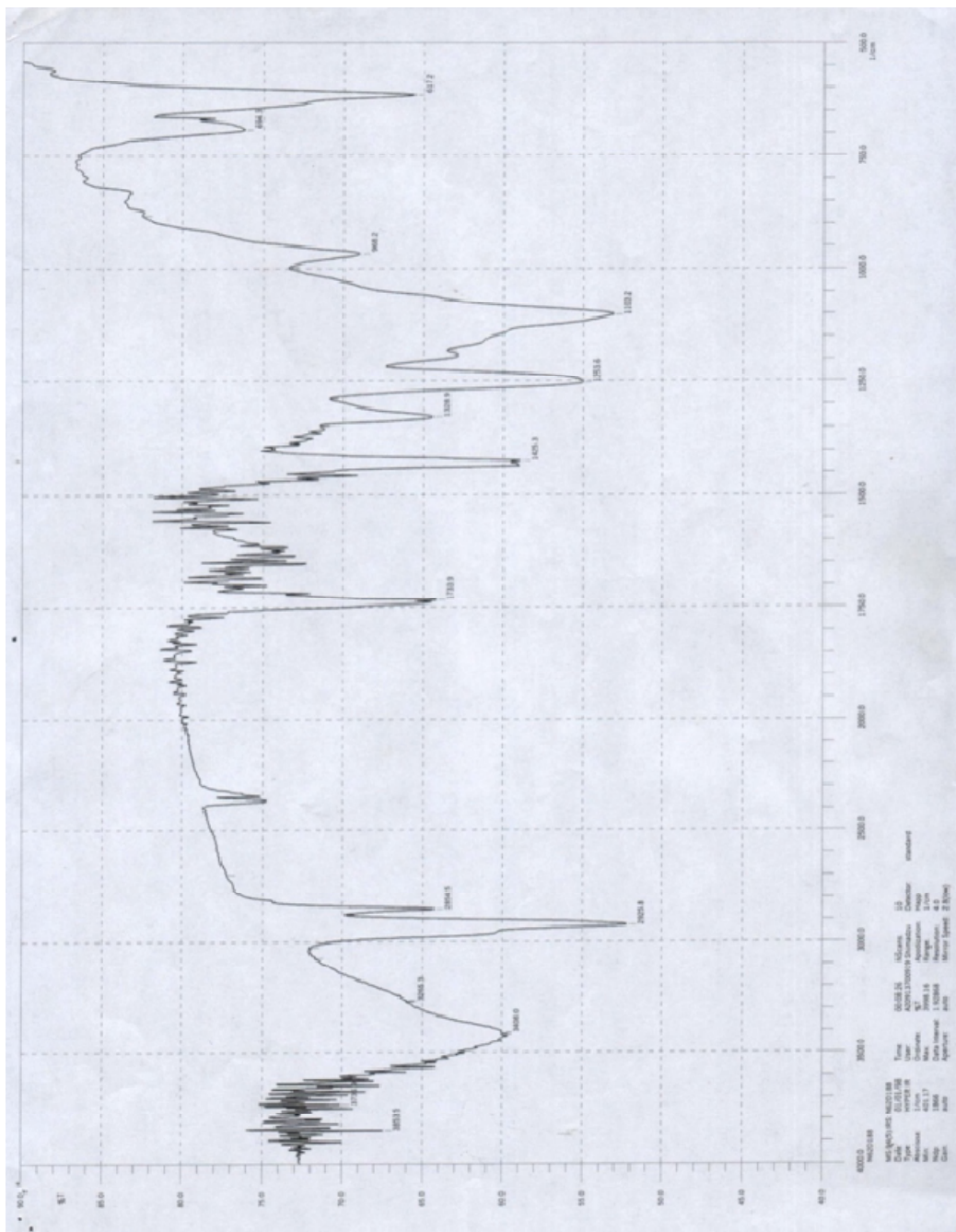


## IV-4-Analyses structurales de des produits:

### IV-4-1-Analyse par la spectrophotométrie FT-IR

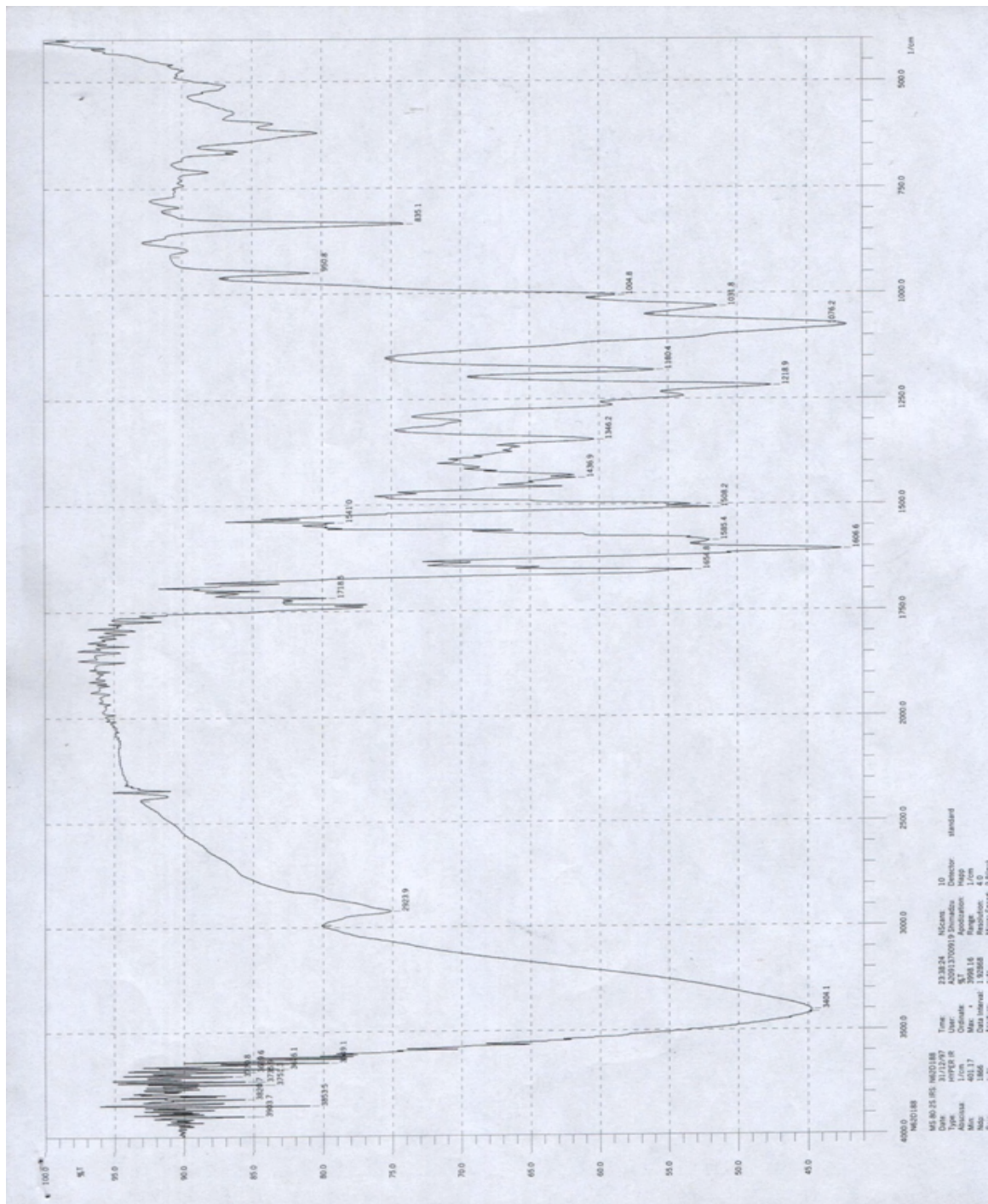
Nous avons soumis à l'analyse structurale les trois produits isolés à partir des fractions 94/6(1) et 80/20(2) 80/20 (3).

#### IV-4-1-a- Le produit (1) issu de la fraction 94/6



Le spectre 1 : Analyse par FT-IR du produit (1) issu de la fraction 94/6

IV-4-1-b- Le produit (2) issu de la fraction 80/20



Le spectre 2 : Analyse par FT-IR du produit (2) issu de la fraction 80/20

### ❖ *Discussion des résultats de l'analyse par FT-IR:*

Selon LEBRETON:

- a) les groupements OH libres sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de  $3300\text{ cm}^{-1}$  ; lorsqu'ils sont engagés dans une liaison hydrogène (OH en position 3 ou 5). La fréquence correspondante est plus basse ( $3100\text{cm}^{-1}$ ).

*Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente à  $3408\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (1) et  $3404.1\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (2).*

- b) une bande d'absorption due aux groupements  $\text{CH}_3$ , se trouve aux environs de  $2930\text{ cm}^{-1}$  : elle est souvent masquée par l'absorption due aux hydroxyles.

*Cette fonction apparait à  $2925.8\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (1).*

- c) une bande d'absorption due aux groupements CO de l'hétérocycle central, se trouve à  $1685\text{ cm}^{-1}$  pour les flavonoïdes dont le carbonyle conjugué uniquement avec le cycle benzénique A : cette fréquence s'abaisse à  $1650\text{cm}^{-1}$  pour les 5-hydroxyflavanones. Dans le cas des flavones, le groupement carbonyle est conjugué avec les deux cycles benzéniques A et B ; pour les 5,7-dihydroxyflavone la bande d'absorption due au groupement CO, se trouve à  $1655\text{cm}^{-1}$  et pour les 7-hydroxyflavone, à  $1630\text{cm}^{-1}$ . Dans le cas des flavanols (3-hydroxyflavones) il y a un abaissement de  $30\text{ cm}^{-1}$  environ par rapport aux flavones homologues.

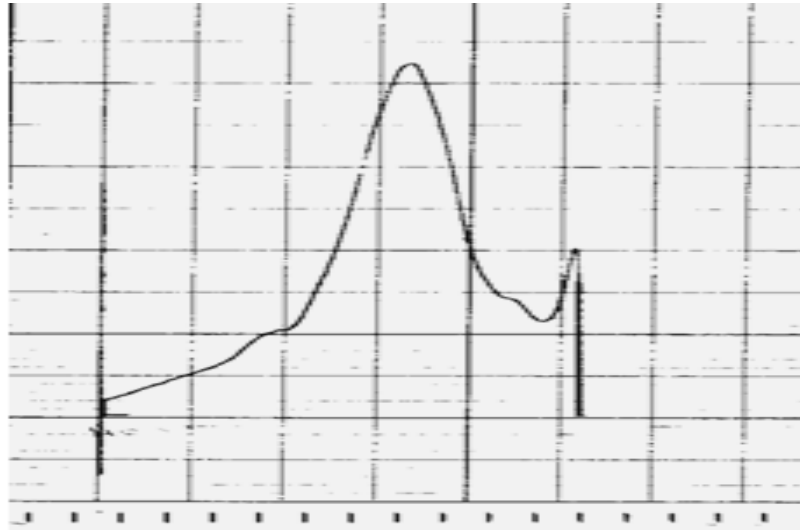
*Les nombres d'onde  $1733.9\text{ cm}^{-1}$  des bandes correspondent à la fonction carbonyle dans le produit (1)*

- d) les doubles liaisons aromatiques ont une absorption entre  $1500$  et  $1610\text{ cm}^{-1}$ . A laquelle s'ajoute éventuellement une bande, à  $1585\text{ cm}^{-1}$  due à la présence d'une double liaison conjuguée avec un cycle benzénique. Nous obtenons cette fonction à  $1606.6\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (2)
- e) les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de  $1360\text{ cm}^{-1}$ , avec éventuellement une absorption secondaire à  $1200\text{ cm}^{-1}$ .
- f) A  $1165\text{ cm}^{-1}$  on observe une bande d'absorption due au cycle benzénique disubstitué en méta (dihydroxy 5-7).
- g) la région du spectre située en dessous de  $1100\text{ cm}^{-1}$  est difficilement interprétable ; on note cependant, aux environs de  $800\text{ cm}^{-1}$ , une bande d'absorption due aux hydrogènes des cycles benzéniques.

Dans nos cas cette fonction est détectée à  $1103.2\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (1) et  $1076.2\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du produit (2) [24].

#### IV-4-2-Analyse par la spectrophotométrie UV-Vis

##### IV-4-2-a- Le produit (2) issu de la fraction 80/20

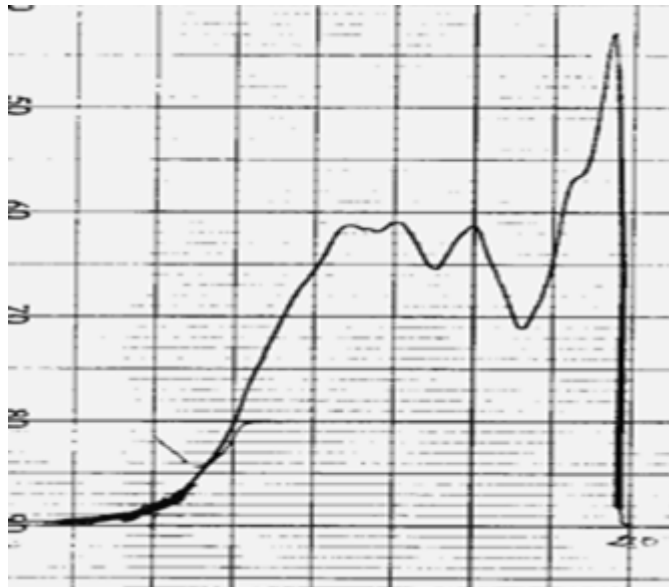


##### Le spectre3: Analyse par UV du produit(2)

Les longueurs d'ondes des bandes caractéristiques de ces produits sont les suivantes:

Pour Le produit (2):  $\lambda_{\text{max1}} = 373\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{max2}} = 202\text{nm}$

##### IV-4-2-b- Le produit(3) issu de la fraction 80/20



##### Le spectre4: Analyse par UV du produit(3)

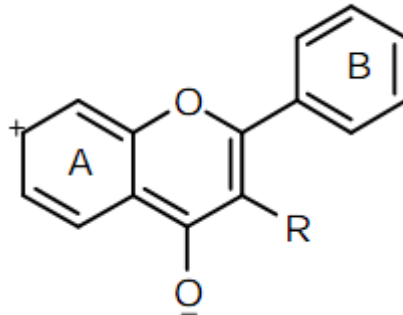
Les longueurs d'ondes des bandes caractéristiques de ces produits sont les suivantes:

Pour Le produit(3):  $\lambda_{\text{max1}} = 338\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{max2}} = 302\text{nm}$ ,  
 $\lambda_{\text{max3}} = 270\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{max4}} = 203\text{nm}$

❖ *Discussion des résultats de l'analyse par UV:*

Le spectre UV-Vis du produit (2) a révélé deux bandes dont les  $\lambda_{\text{max}}$  sont:

-  $\lambda_{\text{max1}} = 373\text{nm}$  très intense qui se situe dans le domaine de l'UV proche, selon le tableau XXXII  $\lambda_{\text{max1}}$  [300-400]. ce qui nous permet de proposer une structure de conjugaison étendue, peut-être une forme proche de la forme benzoyle. Relative aux flavonoïdes



**Figure 21: Forme benzoyle**

-  $\lambda_{\text{max2}} = 202\text{ nm}$  correspond à une faible bande dans le domaine UV- lointain, elle peut-être due à un chromophore isolé ou probablement c'est dû au solvant. Avec cette valeur de  $\lambda_{\text{max2}}$ , on n'a pas pu confirmer la structure flavonique.

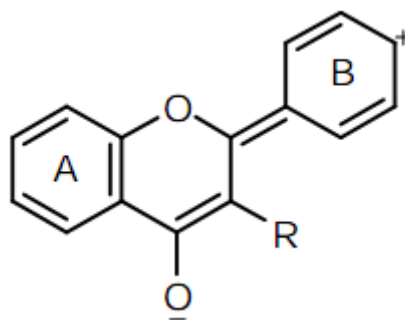
Le spectre UV-Vis du produit (3) n'est pas clair, mais il a montré des bandes dont les  $\lambda_{\text{max}}$  sont les suivantes:

-  $\lambda_{\text{max1}} = 338\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{max2}} = 302\text{nm}$  qui se situent dans le domaine de l'UV proche.

Selon le tableau XXXII.  $\lambda_{\text{max1}}$  appartient à cet intervalle [300nm-400nm]. Ce qui nous permet de proposer une structure à une grande conjugaison, peut-être une forme proche de la forme benzoyle (**Figure 22**) relative aux flavonoïdes.

-  $\lambda_{\text{max3}} = 270\text{nm}$  qui montre une absorbance dans le domaine de l'UV proche Selon le tableau XXXII,  $\lambda_{\text{max3}}$  appartient à l'intervalle [230nm-285nm].

Cela peut être une structure proche de la forme cinnamoyle. relative aux flavonoïdes



**Figure22 : Forme cinnamoyle**

$\lambda_{\text{max4}} = 203\text{nm}$  correspond à une bande très intense dans le domaine de l'UV lointain.

La structure du produit (3) peut-être une structure flavonique car son spectre UV a montré les deux bandes caractéristiques des flavonoïdes.

- Mais son analyse par d'autres techniques plus performantes (RMN ( $^1\text{H}$ ), MS.....) reste indispensable pour confirmer cette structure.

**TableauXXXIII: Déplacements des maximums des bandes I et II remarqués dans le méthanol des principales classes de flavonoïdes [14].**

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Type de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavone
250-280	330-360	Flavonol "3-OR"
250-280	350-385	Flavonol "3-OH"
245-275	310-330	Isoflavone
275-295	330-300	Flavanone ou dihydroflavonol
230-270 Intensité basse	340-390	Chalcone
230-270 Intensité basse	380-430	Aurone
270-280	465-560	Anthocyanidine ou anthocyanine



#### **IV-5-Méthode de la réduction de fer (FRAP)**

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Elle est universelle et peut être appliquée aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux.

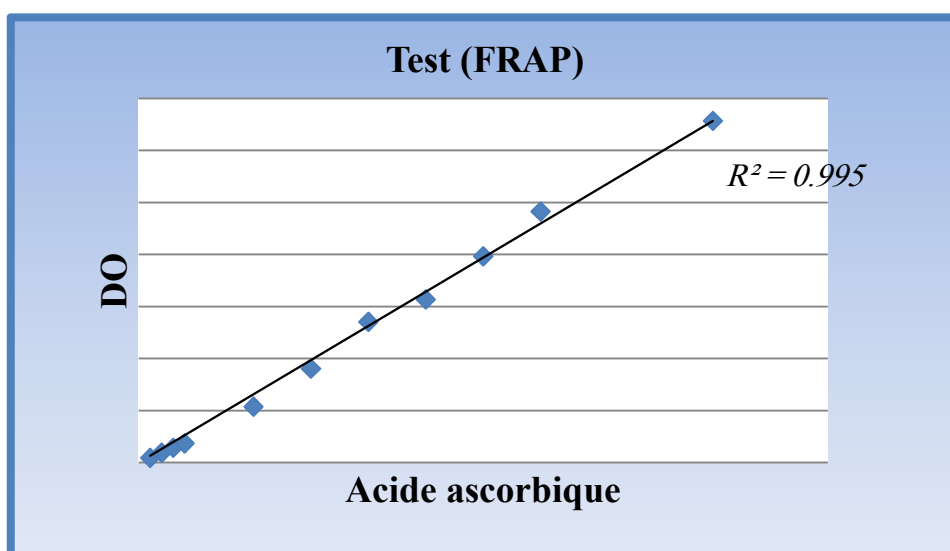
Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{+3}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$ . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants.

Dans notre travail nous avons opté pour tester les extraits méthanolique et celui obtenu par l'acétate d'éthyle.

L'acide ascorbique (AA) est utilisé comme antioxydant de référence (figure 23).

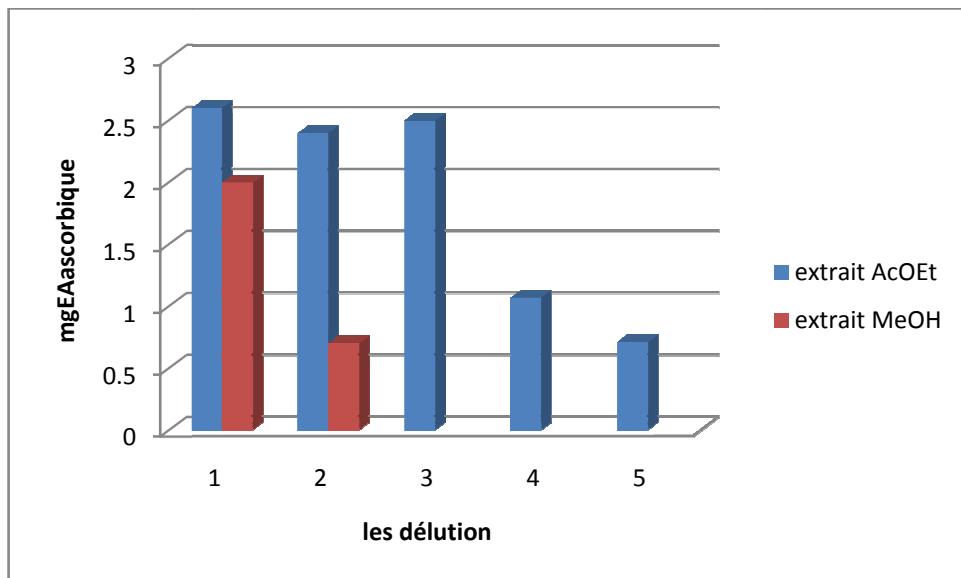
Les résultats obtenus illustrés par la figure 24, montrent que la capacité de réduire le fer est presque la même pour les deux extraits à grandes concentrations alors qu'à des faibles valeurs, l'extrait AcOEt s'est montré plus efficace.

En tant que bons donneurs d'électrons, ce type de composés montre la capacité réductrice sur la réduction de  $Fe^{+3}$  en  $Fe^{+2}$ . Ainsi, la plante *Matricaria pubescens* qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans cette inhibition.



**Figure 23 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique par la méthode FRAP**





**Figure 24 : Représentation graphique des résultats du test FRAP**

Le test FRAP est parmi les tests les plus utilisés dans la littérature. Pour déterminer les capacités antioxydantes des extraits naturels, la recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues de plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. L'intérêt croissant des effets bénéfiques de l'antioxydant sur la santé sont très efficace contre les radicaux libres.

Dans notre cas, la méthode FRAP a révélé que l'extrait AcOEt possède un pouvoir réducteur plus fort que celui du méthanol. Cela revient peut être aux calasses de polyphénols contenues dans les deux extraits.

D'après la synthèse bibliographique et les résultats obtenus, on peut dire que les flavonoïdes de classes : mono-o-glycosides et di-o-glycosides sont plus concentrés dans l'extrait AcOEt, et ils sont très efficaces en tant qu'antioxydants.

*Conclusion*

## Conclusion

L'objectif de notre travail a été partiellement atteint vu les moyens disponibles limités du point de vue analytique. Néanmoins, l'étude phytochimique de l'espèce *Matricaria pubescens* que nous avons menée nous a permis de mettre en évidence des résultats qui nous semblent exploitables pour un travail ultérieur sur cette plante. Son choix a été dictée par son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier la purgation. L'étude bibliographique préalable réalisée sur cette espèce a montré qu'il y a très peu de travaux publiés à caractères analytiques chimique ou biochimique.

Dans ce travail, nous avons pu isoler quelques métabolites secondaires majoritaires de cette plante. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques. Nous avons pu obtenir 3 produits purs par la chromatographie préparative qui ont été analysés par les méthodes spectroscopiques IR et UV/Vis.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, le test FRAP a été utilisé, et les résultats ont montré que l'extrait méthanolique et l'extrait acétate d'éthyle sont tout les deux moyennement actifs.

A l'instar des résultats expérimentaux obtenus, nous avons acquis une assez bonne maîtrise de quelques techniques analytiques simples en passant de l'extraction aux séparations et enfin à l'analyse structurale des polyphénols.

Notons enfin que ce travail permettra d'envisager des horizons de recherche ciblés dans l'axe que nous avons initié sur cette plante saharienne. A cet effet, nous pouvons suggérer les perspectives suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Matricaria pubescens*. afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- Etudier l'activité de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmer l'activité biologique attribuée à cette plante.
- Contribuer à la mise en évidence de certains principes actifs de cette plante.

# *Références bibliographiques*

- [1] S.Belkacem ., (2009),"Investigation phytochimique de la phase n-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *centaurea parviflora* (compositae)",Mémoire magister, Université Mentouri – Constantine, pages1.
- [2] N.Benkiki.,(2006),"Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana* ,*Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*".Thèse doctorat .Université el hadj lakhder Batna ,pages 8,112-125.
- [3] K. Kanoun., (2011),"Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis l.* (rayhane) de la région de tlemcen (honaine)", Mémoire magister, Université Aboubekr Belkaid –Tlemcen, 2.
- [4] A.Benguerba ., (2008),"Etude phytochimique et de la phase butanoliquede l'espece *inula crithmoides l*", mémoire magister, Université mentouri-constantine, 5-14.
- [5] N .Mezache., (2010) ,"Determination structurale et évaluation biologique de substances naturelles dequelques especes de la famille asteraceae: *Senecio giganteus Desf. et Chrysantemum myconis l*", Thèse doctorat, Université mentouri-Constantine, 4, 5, 17,23-26.
- [6] fr .Wikipedia.org/wiki/Matricaraire
- [7]B.Zarrou.,(2012),"Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de le plante *Matricaria Pubescens* (Astéracées) et evaluation de leur activité antioxydante", Mémoire master, Universite Kasdi Merbah Ouargla,1.
- [8] M. Ould El Hadj Didi, M. Hadj-Mahammed, H. Zabeirou., " Place des plantes spontanees dans la médecine traditionnelle de la region d'ouargla ", Courrier du Savoir, 03(2003), page 50.
- [9] A, Chahma., "Cataloge des plantes spntanees du sahara septentrional algerien", Dar elhoda ain m'ila ,2006.
- [10]<http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/details/species/id/9508016/synonym/9569031>
- [11] K. Maizak, R.A. Brac de la perriere, V. Hammiche., "Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional", actes du 2<sup>eme</sup> colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, 1993,169-181.
- [12] ] O. Gherbouj,N. Benkiki, E. Seguin, F. Tillequin, Z. Kabouche., *journal chemistry of natural compoundes* 3(2012) ,470-471.

- [13] S. Akroum(2011)., "Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, mémoire magister, Université Mentouri de Constantine ", 14,20,82.
- [14] A. Boutiti., (2004),"Etude phytochimique de l'espece *Globularia Alypum l'*", Mémoire magister. Université Mentouri de Constantine. 11, 12,15.
- [15] A. Madi., (2009),"caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques", Mémoire magister, Université Mentouri Constantine.
- [16] R. Seghiri., "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea : C. Africana, C. Nicaensis*", These doctorat, Université Constantine-55 .
- [17] N.Zeghad (2009),"Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne", Mémoire magister, Université Constantine.
- [18] ن.حاجي،(2010) ، " مقارنة كمية وكيفية اولية للمركبات الفلافونيدية لمستخلصي البيتانول والاسيتات لنبات البرسيم *Medicago Sativa L* " مذكرة ماستر، جامعة قاصدي مرباح –ورقلة، 7-8.
- [19] Tripoli, M La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo, M. Giammanco., *Journal of food chemistry* .,104 (2007) 466–479.
- [20]F.Bouzeroune., "Etude phytochimique de plante *Helianthemum Kahiricum*", Mémoire magister, Université Batna.
- [21]S. Athamena(2009).,"Etude quantitative des flavonoïdes des grainent de cuminum cyminum et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation", Mémoire magister, Université Batna,26.
- [22] C. Popovici., *Journal Revue de génie industriel*, 2009, 4, 25-39.
- [23] P.Riberau-Gayon.les., "Composes phénoliques des végétaux", éd Dunod, 1968, 113-143.

## الملخص:

يكن هدف هذا البحث في دراسة نواتج الأيض الثانوي وفعاليتها المضادة للأكسدة خصوصا الفلافونيدات لمستخلص خلاات الايثيل لنبات *Matricaria pubescens* المستعملة في الطب الشعبي.

انجاز هذا البحث تطلب استعمال طرق و تقنيات الاستخلاص (استخلاص صلب-سائل، استخلاص سائل-سائل) والطرق الكروماتوغرافية المختلفة ( كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM، كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد CP ، كروماتوغرافيا العمود CC) وطرق التحليل الفيزيائية (مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV-Vis ، مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR ) مما سمح لنا بتشخيص وجود الفلافونيدات وتم تمييز بعض عائلاتها .

تمكنا من فصل 5 مركبات نقية تم التعرف على نقاوتها بواسطة CCM ولتشخيص البنية الكيميائية استعملنا مركبين كمثالين حيث تم التعرف على بنية الوظائف الكيميائية الموجودة بهما بواسطة FT-IR و UV-Vis.

أظهرت النتائج المتحصل عليها من اختبار الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصي الميثانول و خلاات الايثيل بطريقة FRAP أن مستخلص الميثانول أقل فعالية من مستخلص خلاات الايثيل .

الكلمات المفتاحية: *Matricaria pubescens* ، الفلافونيدات ، الكروماتوغرافيا ، الفعالية المضادة للأكسدة.

## Résumé:

L'objectif de notre travail est une contribution à l'étude des produits du métabolisme secondaire et l'évaluation de leur activité antioxydante, notamment les flavonoïdes de l'extrait tate d'éthyle de l'espèce *Matricaria pubescens* utilisée en médecine traditionnelle.éac (extraction solide-liquide A cet effet, nous avons utilisé les différentes méthodes d'extraction et liquide-liquide), et nous avons fait appel aux techniques de séparation chromatographiques à savoir: la chromatographie sur couche mince CCM, la chromatographie sur papier mono et bidimensionnelle CP, et la chromatographie sur colonne (CC).

La purification de quelques produits isolés a permis de confirmer l'existence des flavonoïdes, et de définir la nature de certaines de leurs familles.

Nous avons pu isoler cinq produits dont deux ont été analysés par UV-Vis et FT-IR ce qui a permis de caractériser les familles chimiques présentes.

Le test FRAP a révélé que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante moins importante que celle de l'extrait de l'acétate d'éthyle.

.antioxydante Mots clés : *Matricaria pubescens*, les flavonoïdes, la chromatographie, activité