



THE.C.H. 01/31/2

UNIVERSITE DE OUARGLA

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Chimie Organique

Option : Hétérocycles

Par : **BENZAHI KHEDIDJA**

Thème

**Contribution a l'étude des
flavonoides dans la plante *Cynodon
dactylon-L "Chiendent"***

Soutenu publiquement le 27 Mars 2001

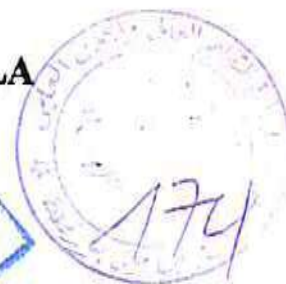
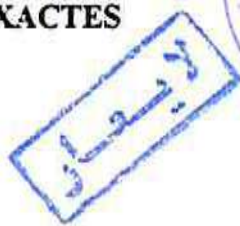
Devant le jury composé de :

Mr	M. HADJ-MAHAMMED, M.Conférences, Univ. Ouargla
Mr	A. CHERITI, M.Conférences, C.Univ. Béchar
Mr	L. SEGNI, M.A.C.C, Univ. Ouargla
Mr	B. DADAMOUSA, M.Conférences, Univ. Ouargla

Président
Examineur
Examineur
Rapporteur

CENTRE UNIVERSITAIRE DE OUARGLA

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES



**Contribution a l'étude
des Flavonoides dans la plante
*Cynodon dactylon (L) Pers " Chiendent "***

MAGISTER

Spécialité : Chimie Organique

Option : Hétérocycles

Par : Khedidja BENZAH

Soutenu publiquement le 27 Mars 2001

Promoteur : Dr Belkhir DADAMOUSA.

Devant le jury composé de :

Mr : M. Hadj-mahammed

Mr : A. Cheriti

Mr : L. Segni

M.C (C.U. Ouargla)

M.C (C.U. Béchar)

M.A.C.C (C.U. Ouargla)

Président

Examineur

Examineur

CENTRE UNIVERSITAIRE DE OUARGLA

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES

**Contribution a l'étude
des Flavonoides dans la plante
*Cynodon dactylon (L) Pers " Chiendent "***

MAGISTER

**Spécialité : Chimie Organique
Option : Hétérocycles**

Par : BENZAHY KHEDIDJA

Soutenu publiquement le 27 Mars 2001

Dédicaces

A mes parents

A mes sœurs et frères

*A S. Rachid, Rabiaa, Abderrahmane
et tous mes amis*

Je dédie ce modeste travail

الملخص

النجيل (القزمية) يتألف من العديد من الأنماط الأحيائية، يبدى اختلاف كبير في الخصائص النباتية و الزهرية.

القمح الزاحف، العشب ذو النهايتين، عرف قبل الطب الحديث، كمسكن ناجع للآلام، و السائل المستخلص منه غالبا ما يستعمل في علاج عسر التبول و في حالات الالتهاب الراجعة إلى الأمراض الزهرية.

و نظرا لانتشار الواسع لهذه النبتة في أرجاء البلاد، أبدينا اهتماما بالمركبات الفينولية (الفلافونيدات و الانتوسيانيدات) التي لها أهمية لدى النباتات، وذلك بإجراء دراسة تتركز على التحليل الكمي و النوعي باستعمال طرق عديدة لاستخلاصها.

و لقد تم تحديد هوية هذه المركبات بالطرق الكروماتوغرافية و كذا الطرق الطيفية.

الكلمات الدالة : النجيل، المركبات الفينولية، الفلافونيدات، الانتوسيانيدات، الكروماتوغرافية، الطرق الطيفية.

Summary

Cynodon Dactylon comprises number of biotypes showing a large variety in the vegetative as well as the floral characteristics.

Creeping wheat, herb with two ends, was known before the discovery of the modern medicaments, as good pains tranquiliser, its infusion was recommended for palliate the urine reserve and attend to inflammation due to venereal sickness.

To a large widespread of this plant in our country we became interested in the phenolic compounds (flavonoids and anthocyanins) that are important for plants. through a study based on quantitative and qualitative analysis with using the different methods of extraction.

These two types of compounds have been identified by chromatographic and characterised by UV spectroscopy.

Key Words : *Cynodon Dactylon*, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, chromatography, spectral method

Avant propos

Ce travail a été effectué au laboratoire d'analyse physico-chimique (centre universitaire de Ouargla) .

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur B. DADAMOUSA . Maître de conférences et directeur de l'institut des sciences exactes au centre universitaire de Ouargla pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail et m'avoir prodigué des encouragements et de précieux conseils , sa disponibilité à mon égard a une part importante dans la réalisation de ce mémoire .

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur M.HADJ MAHAMMED Maître de conférences et directeur de la post-graduation au centre universitaire de Ouargla , pour ses conseils judicieux , et son aide efficace tout au long de mon travail , et pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de ce mémoire

Monsieur A. CHERITI Maître de conférences au centre universitaire de Béchar a bien voulu accepter de se déplacer pour juger ce travail, je le prie de trouver ici l'expression de ma vive reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur L.SEGNI Maître assistant chargé de cours à L'institut de chimie industrielle (centre universitaire de Ouargla) pour ses conseils efficaces pour tout ce qui concerne l'étude chromatographique , et l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer au jury de ce mémoire .

J'exprime mes remerciements :

A Messieurs ZERROUKI et MANSOURI pour m'avoir accueilli dans le Laboratoire CRD Hassi- Messaoud

A Mme Z.HAMDI directrice de chimie analytique (SAIDAL) pour son aide concernant les analyses HPLC .

Mes vifs remerciements vont également :

Aux personnels du Laboratoire de l'institut d'agronomie saharienne (centre universitaire de Ouargla) .

A mes camarades du Laboratoire pour leur vive sympathie et les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant l'élaboration de ce manuscrit.

SOMMAIRE :

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES.....	2
1 / Les composés polyphenoliques.....	3
1-1/ Les flavonoides.....	3
1-2/ Classification chimique.....	4
1-3/ Biogenèse.....	6
1-4/ Activités biologiques.....	7
1-5/ Propriétés physico-chimiques.....	8
2 / Chiendent.....	10
2-1/ Classification d'espèce.....	10
2-2/ Description.....	10
2-3/ Composition chimique.....	11
2-4/ Usages.....	11
2-5/ Mode de multiplication.....	11
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	13
1 / Présentation de la région d'étude (la récolte).....	14
1-1/ Séchage.....	15
1-2/ Tests Chimiques.....	15
2 / Extraction et Dosage des composés flavoniques.....	18
2-1/ Extraction des Aglycones, des anthocyanes et des C- glycosides.....	18
2-2/ Dosage des composés flavoniques.....	23
2-2-1/ Matériels et Appareillages.....	25
2-2-2/ Résultats et Discussions.....	25
2-2-3/ Conclusion.....	29
2-3/ Extraction des Hétérosides.....	30
3 / Analyse Chromatographique.....	32
3-1/ La séparation sur papier et sur couche mince.....	32
3-1-1/ les conditions de séparation pour les classes flavoniques.....	34
3-1-2/ Résultats et Discussions.....	36
3-2/ La séparation sur colonne.....	44
3-3/ Chromatographie liquide à haute performance.....	44
3-3-1/ Matériels et Appareillages	46
3-3-2/ Résultats et discussions.....	47
3-4/ Chromatographie en phase gazeuse.....	52
3-4-1/ Matériel et Appareillages.....	52
3-4-2/ Résultats et Discussions.....	54
3-5/ Conclusion.....	58
CHAPITRE III : IDENTIFICATION STRUCTURALE DES COMPOSES FLAVONIQUES.....	59
CHAPITRE IV : INFLUENCE DU CLIMAT ARIDE SUR LA TENEUR DES PLANTES EN FLAVONOÏDES.....	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1	: Réactions caractéristiques des Flavonoides.....	9
Tableau II-1	: Teneur en Aglycones dans les différentes parties de..... la plante.	25
Tableau II-2	: Teneur en Anthocyanes dans les différentes parties de la plante.	26
Tableau II-3	: Teneur en C-glycosides dans les différentes parties de la plante.	27
Tableau II-4	: Rassemble les variations de la teneur des composés..... Flavoniques dans les trois parties de la plante.	28
Tableau II-5	: Couleurs des Flavonoides avec ou sans réactifs.....	33
Tableau II-6	: Rf des composés Aglyconiques séparés sur gel..... de silice.	36
Tableau II-7	: Rf des composés Aglyconiques séparés sur Alumine.....	36
Tableau II-8	: Rf des composés Aglyconiques séparés sur cellulose.....	37
Tableau II-9	: Rf des composés Anthocyaniques séparés sur les..... différents types de phases stationnaires	39
Tableau II-10	: Rf des composés Hétérosidiques séparés sur les..... différents types de phases stationnaires.	41
Tableau II-11	: Temps de rétention de quelque étalons..... (dans les 2 ^{ème} conditions). (HPLC)	45
Tableau II-12	: Temps de rétention et les concentrations des..... fractions Aglyconiques (dans les 2 ^{ème} conditions) (HPLC)	47
Tableau II-13	: Temps de rétention et les concentrations des..... fractions Anthocyaniques (dans les 2 ^{ème} conditions) (HPLC)	49
Tableau II-14	: Temps de rétention et les concentrations des..... fractions Hétérosidiques(dans les 2 ^{ème} conditions). (HPLC)	50
Tableau II-15	: Temps de rétention des fractions des extraits..... {Aglycones et Anthocyanes}. (CPG)	54
Tableau IV-1	: Données climatiques de la région de Ouargla.....	73
Tableau IV-2	: Rf des composés séparés sur gel de silice pour l'extrait des Aglycones en deux périodes.	75
Tableau IV-3	: Rf des composés séparés sur gel de silice pour l'extrait des Anthocyanes en deux périodes.	77
Tableau IV-4	: Teneur en Aglycones (en deux périodes).....	80
Tableau IV-5	: Teneur en Anthocyanes (en deux périodes).....	80
Tableau IV-6	: Teneur en C-glycosides (en deux périodes).....	80

ANNEXES

Tableau N°1 : Temps de rétention des composés Aglyconiques	91
(HPLC dans les 1 ^{er} conditions).	
Tableau N°2 : Temps de rétention des composés Anthocyaniques.....	91
(HPLC dans les 1 ^{er} conditions).	
Tableau N°3 : Temps de rétention des composés Hétérosidiques.....	92
(HPLC dans les 1 ^{er} conditions).	
Tableau N°4 : Couleur des composés aglyconiques avant et après l'ajout.....	99
de l'ammoniaque	
Tableau N°5 : Couleur des composés anthocyaniques avant et après l'ajout...	99
de l'ammoniaque	
Tableau N°6 : Couleur des composés hétérosidiques avant et après l'ajout.....	100
de l'ammoniaque	

LISTE DES FIGURES

Fig II-1	: Chiendent.....	14
Fig II-2	: Résultats de CCM d'extrait des Aglycones.....	38
Fig II-3	: Résultats de CCM d'extrait des Anthocyanes.....	40
Fig II-4	: Résultats de CCM d'extrait des Hétérosides.....	42
Fig II-5	: Chromatogramme HPLC des Aglycones en mode Isocratique (dans les 2 ^{ème} conditions).	48
Fig II-8	: Profil CPG des Aglycones.....	56
Fig II-9	: Profil CPG des Anthocyanes.....	57
Fig III-1	: Spectre UV des Aglycones.....	65
Fig III-4	: Spectre UV de composé n°=1 des Aglycones.....	67
Fig III-5	: Spectre UV de composé n°=2 des Hétérosides.....	69
Fig IV-1	: Résultats de CCM d'extrait des Aglycones en deux. Périodes.	76
Fig IV-1	: Résultats de CCM d'extrait des Anthocyanes en deux..... Périodes.	78

ANNEXES

Fig II-6	: Chromatogramme HPLC des Anthocyanes en mode Isocratique (dans les 2 ^{ème} conditions). (annexe)	89
Fig II-7	: Chromatogramme HPLC des Hétérosides en mode Isocratique (dans les 2 ^{ème} conditions).(annexe)	90
Fig 1	: Chromatogramme HPLC des Aglycones en mode..... Isocratique dans les 1 ^{ère} conditions.	93
Fig 2	: Chromatogramme HPLC des Anthocyanes en mode..... Isocratique dans les 1 ^{ère} conditions.	94
Fig 3	: Chromatogramme HPLC des Hétérosides en mode..... Isocratique dans les 1 ^{ère} conditions.	95
Fig 4	: Profil CPG de Ethanol.....	96
Fig 5	: Profil CPG de Méthanol.....	96
Fig III-2	: Spectre UV des Anthocyanes (annexe).....	97
Fig III-2	: Spectre UV des Anthocyanes (annexe).....	98

LISTE DES SCHEMAS

Schéma I-1 : Squelette de base des flavonoides.....	3
Schéma I-2 : L'origine bio synthétique des flavonoides.....	6
Schéma II-1 : Extraction, identification et dosage des Aglycones..... Anthocyanidines et les C-glycoflavones.	20
Schéma II-2 : Les étapes d'extraction et d'identification des hétérosides.....	31

La phytothérapie a été utilisée depuis la nuit des temps pour guérir et pour prévenir, d'autant que la valorisation de cette médecine traditionnelle demeure un sujet plus important pour notre pays.

Sachant que le Sahara représente les trois quarts des terres de notre pays, et qu'il contient une vaste flore pratiquement inexplorée.

Et de ce point de vue de source inépuisable des produits a haute valeur actuellement importé (en terme d'extraits végétaux l'Algérie importe en moyenne 10 à 15 tonnes d'extraits végétaux par an)[Anonyme 2001].

De ce fait nous avons essayé d'étudier une plantes appelées le chiendent (*Cynodon dactylon*), car il contient des activités thérapeutiques importantes sur la santé humaine, due à des substances naturelles existant dans cette espèce.

Nous nous sommes intéressé à l'identification d'une de ces substances appelées les flavonoides, responsables de certaines caractéristiques essentielles de la plante (anti-inflammatoire, anti-allergique, diurétique...), et pour isoler ce principe actif on a procédé selon les étapes suivantes :

- Extraction de principe actif.
- Etude quantitative et qualitative.
- Influence des conditions climatiques sur le principe actif.

Le mémoire que nous présentons comporte quatre parties.
Dans la première partie nous décrivons des généralités sur l'espèce et le principe actif.

La deuxième partie est consacrée à l'extraction de différentes classes flavoniques et la mise en évidence par les méthodes suivantes :

- La spectrophotomètre UV.
- Les méthodes chromatographiques (CCM, HPLC et CPG)

La troisième partie est consacrée à l'étude structurale des produits séparés par CCM.

La quatrième partie du mémoire rassemble les résultats de l'influence des conditions climatiques sur les flavonoides. Appareillages

CHAPITRE I : ***Généralités***

1/ LES COMPOSES POLYPHENOLIQUES :

Les composés phénoliques extrêmement répandus chez les êtres vivants, surtout chez les micros organismes, et les plantes comprennent obligatoirement au moins un noyau benzénique, on peut distinguer parmi ces composés largement répandus [23][10][9] :

- les acides benzoïques, les acides cinnamiques et coumarines
- les flavones, flavonoles et dérivés voisines
- chalcones, dihydrochalcones et aurones
- les proanthocyanes

Plusieurs auteurs rapportent qu'en général ces composés sont sous formes des hétérosides ou des esters [9][23].

Parmi ces composés phénoliques on va étudier une vaste classe des substances poly phénoliques appelés « les flavonoides ».

1-1/ LES FLAVONOIDES :

Les flavonoides ainsi que d'autres phénols présentant la même activité physiologique sont d'origine végétale et particulièrement dans les aliments stimulants « café, thé, cacao, vins » [15][4][32][12], il est surtout abondant en particulier dans certaines familles des plantes, telle que « polygonacées, rutacées, légumineuses, ombelliféracées et composées », présents dans tous les organes aériens, ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux)[15].

Ils sont presque toujours hydrosolubles et responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles : les chalcones, aurones, flavanones, flavonols (jaune), 2,3-dihydroflavonol ou flavanonols, flavone (ivoire) anthocyanidine (rouge-bleu ou violet) [26][4][32], dans certain cas la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet [15][4][32].

1-2/ Classification chimique :

Tous les flavonoides on compte plus de 4000 composés ont une origine bio synthétique commune et, de ce fait, possèdent le même squelette de base a « 15 » atomes de carbones constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3

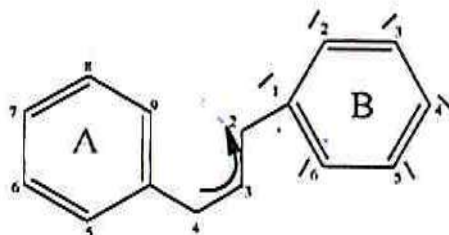


Schéma I-1 : squelette de base des flavonoides

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classe selon le degré d'oxydation de la chaîne C3 [8][9][32][23].

1°/ 2-phényl benzopyriliiums, anthocyanes

2°/ phényl chromane

i) flavones, flavonol, et leur dérivés

ii) flavanones et dihydroflavonole

iii) isoflavanones – isoflavones

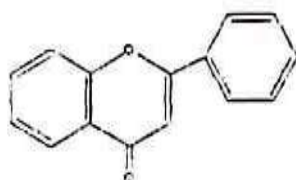
3°/ 2-phénylchromane

i) flavanes

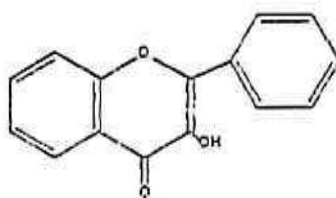
ii) flavan-3-ols, flavan-3,4-diols

4°/ chalcones et dihydrochalcones

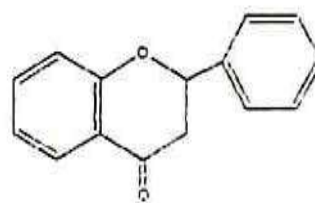
5°/ benzylidène coumaranones (aurones)



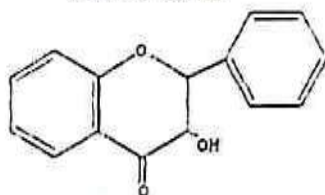
FLAVONE



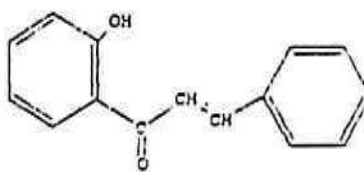
FLAVONOL



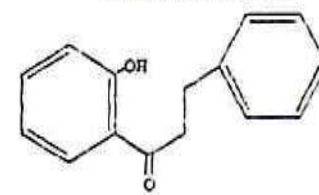
FLAVANONE



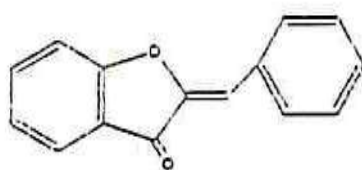
FLAVANONOL



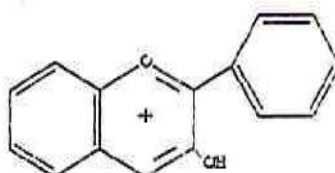
CHALCONE



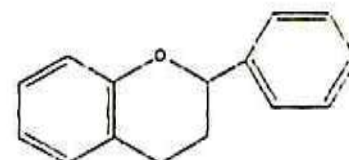
DIHYDROCHALCONE



AURONE



ANTHOCYANIDINE



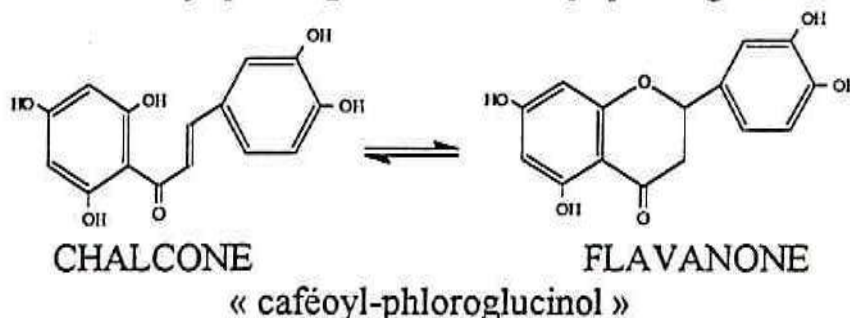
CATECHINE



FLAVAN-3,4-DIOL

Les composés flavoniques se présentent habituellement dans les plantes sous forme des glucosides, dont la plupart des groupes (OH) phénoliques sont combinés avec du sucre [8].

Les groupes hydroxyles sont toujours trouvés à la position 5, 3 ou 7 dans le cycle « A », et peuvent être considérées théoriquement comme résultant de la cyclisation d'un cinnamoyl-phloroglucinol « caféoyl-phloroglucinol »[9]



Le cycle « B » ordinairement porteur des (OH) ou des groupes alkoxyl en position 4' ou en positions 3' et 4' [8][9][32].

D'autant plus les flavonoides peuvent être sous forme d'hétérosides, sachant que la partie osidique peut être mono, di ou trisacharidique, il existe deux types d'hétérosides [18] :

- O-hétéroside
- C-hétéroside

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un des hydroxyles phénoliques de la génine mais, en règle générale ce sont surtout les hydroxyles en position « 7 » des flavones et les hydroxyles en « 3 » des flavonols qui sont impliqués, et cela dans le cas de O-glycosile.

Les C-hétérosides : on en connaît plus de 300, la liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre et le carbone en position 6 ou 8 de la génine [32].

1-3/ Biogenèse :

La biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun la 4,2,6,4'-tétrahydroxy chalcone qui est le résultat de la fixation de 3 chaînons de l'acétate sur l'acide p-coumarique [15][8], et par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune est métabolisée en différentes classes de flavonoides [34], et les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants, groupements (OH), méthoxyles et d'autres groupements sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire [15][8][32],

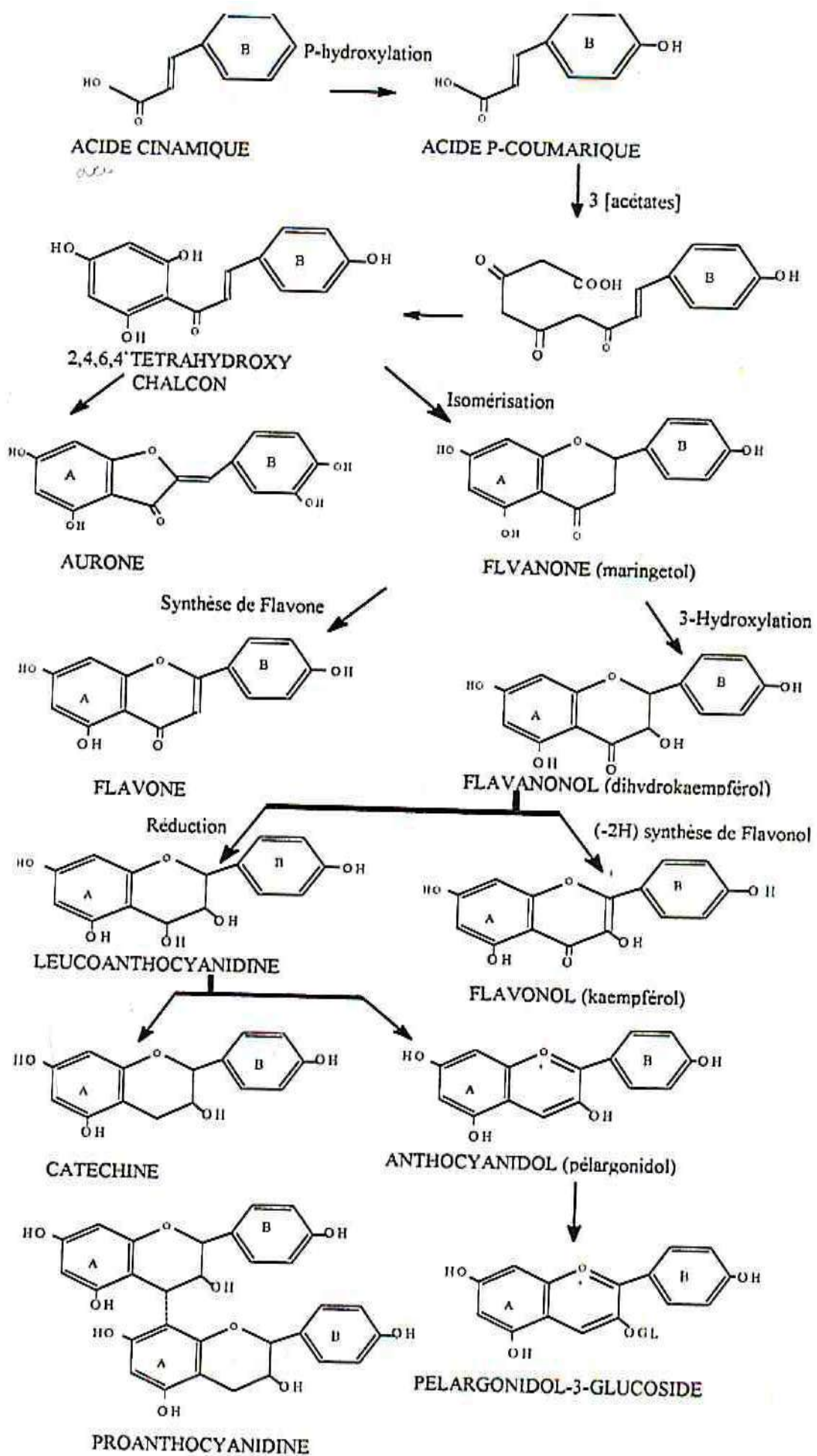


Schéma I-2 : L'origine bio synthétique des flavonoides

2-4/ Activités biologiques :

Les pigments flavoniques sont pratiquement universels dans les feuilles et pétales, on les trouve fréquemment dans d'autres organes « fruits, racines, bois etc. », La principale activité attribuée aux flavonoides et incontestablement un rôle d'appel « couleur des fleurs et fruits » afin d'attirer les insectes et d'autres animaux vers les plantes pour la pollinisation et la dispersion des graines [23][13]

Par ailleurs, les pigments flavoniques sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse, leur action se situe au niveau des petites veines ou des capillaires, elles augmentent la résistance des capillaires (l'action vitaminique P).

Les flavonoides sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires [15][4][23][32].

En dehors de cette action physiologique générale certains composés flavoniques possèdent des activités particulières telle que :

2-4-1 / Activité antifongique :

trois familles principales de flavonoides ont été testées contre 4 champignons pathogènes des grains de céréales « *alternaria alternata*, *cladosporium herbarum*, *fusarium oxysporum* et *trichoderma herzianu* » sont la flavone, flavanone et la flavonol, la flavone et flavanone sont les plus efficaces [37].

2-4-2 / Activité anti-inflammatoire :

Quelques composés flavoniques tel que la rutine le rutoside et la quercitine ont un rôle dans les pathologies circulatoires comme anti-œdémateux, veinotonique, vasculoprotecteur et comme anti-inflammatoire. [36][15][32].

D'autre part l'apigénol, chysine, taxifoline, 8-glycosyl hypolaetine, gossypine sont connus par leurs interactions avec le métabolisme de l'acide arachidonique qui joue un rôle important dans les phénomènes inflammatoires.

2-4-3 / Activité antivirale :

De nombreux flavonoides réagissent avec les radicaux libres, empêchant ainsi les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides qui sont les responsables de la fusion du manteau viral et de la membrane de la cellule hôte [36][32].

2-4-4 / Hépatoprotecteur :

les composés flavoniques ayant une structure de type catéchine comme « isobutrine, hispiduline, flavanolignames inhibent l'action d'inducteurs de toxicité chez des hépatocytes de rat [32][36], de plus ils ont un effet anti-allergiques [32].

2-4-5 / Hypotension :

La «6,8-diglucosylapigénine » peut provoquer notamment une baisse de pression artérielle chez le rat [36].

* D'autres composés flavoniques peuvent avoir une fonction importante dans les industries agricoles et les industries alimentaires, comme colorants des boissons et anti-oxydants, ils peuvent être aussi des précurseurs de tanins[8][32][23][22].

* On peut constater d'autre rôle biologique des flavonoides comme antispasmodique, anti-bactériens, hypocholestérolémiant, anti-agrégante plaquettaire, anti-tumorales, anti-azotémique, diurétique et anti-ulcère gastrique [15][8][32].

* Ce sont des molécules pratiquement atoxiques biologiquement et bien tolérés chez l'homme, mais leur action est lente [15].

2-5/ Propriétés physico-chimiques :

2-5-1/ Solubilité et Extraction :

D'une façon générale les hétérosides sont hydrosolubles (surtout à chaud), soluble dans les alcools, et les autres solvants organiques polaires, insoluble dans les solvants organiques apolaires, bon nombre d'entre eux ont une hydrosolubilité plutôt faible par exemple « le rutoside, hespéridoside etc..... ».

Les génines sont solubles dans les solvants organiques apolaires, lorsqu'elles ont au moins un groupe phénolique libre, elles se dissolvent dans les solutions d'hydroxydes alcalins (ammoniacale ou potasse), les génines sont peu solubles dans l'eau [15][32].

Donc les flavonoides sont extraits par des solvants moyennement polaires (dichlorométhane etc....) ou avec les alcools ou l'eau à chaud, les hétérosides peuvent être extraits par l'acétone ou l'alcool (éthanol, méthanol ...) par l'addition d'eau « 20 à 50 % » [32].

On obtient parfois la cristallisation des hétérosides par simple refroidissement des solvants extractifs [15].

Après la séparation des composés flavoniques par l'une des méthodes chromatographiques (CP, CCM, CC, HPLC, CPG etc.....).

2-5-2/ caractérisation :

Elle est effectuée par de nombreuses réactions colorées afin de caractériser les flavonoides, en dehors de la coloration jaune donnée par les alcalis (NH₄OH) voir le tableau I-1.

TABLEAU I-1 : Réactions caractéristiques des flavonoides

Le réactif	La type des flavonoides	La couleur caractéristique
La réaction de cyanidine	Les hétérosides	Orange (flavone) rouge (flavanone) [15]
Les vapeurs d'ammoniaque	Dans le cas de chalcone et aurone	Orange et rouge [15][4][32]
Tri chlorure d'aluminium	Tous les flavonoides	Des couleurs déférentes
1% ester de : 2-aminoethanole et d'acide diphénylborique « naturstoff reagenz A »	* Les flavonols ayant un (OH) libre en position 4' *les composés ayant les systèmes orthodihydroxyle en 3' et 4'	* En jaune –vert (triticine, isorhamnétine) * En orange (lutéoline, quercétine) [15][32][23]
*Chlorure ferrique (FeCl ₃) *Anis aldéhyde *acide sulfamilique di-azoté	Tous les composés phénoliques	Des couleurs différents [15][32]
Réaction avec la poudre de magnésium Mg en milieu chlorhydrique	Flavanones et dihydroflavonols [32]	
Borohydrure de sodium avec la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	Dihydrochalcone [32]	

* L'étude structurale s'effectue à l'aide des réactifs spécifique telle que (NaOMe, NaOAc, H₃BO₃, HCl « 2N », AlCl₃) et par les spectres UV on détermine la nature de la substitution des composés, sans oublier d'autres techniques qui peuvent nous aider à déterminer la structure des composées comme (IR, UV, MS, RMN¹³C et ¹H, HPLC, CPG) [32] [23][24][11]

1/ LE CHIENDENT :

Il existe deux espèces de chiendent : [29]

- *Agropyrum Repens* ou le *Triticum Repens*
- *Cynodon Dactylon* « L » Pers

Le dernier type est l'espèce répandue dans le midi de la France, d'Italie et d'Afrique du Nord [17], comme elle se trouve dans tout le Sahara d'Algérie, les lits d'Oued et les cultures cosmopolites. [42]

Il s'agit d'un sorte de gazon envahissant, considéré comme mauvaise herbe par les agriculteurs, cependant du point de vue médicinal il est plein de vertus par ses principes actifs, il doit son nom à son utilisation instinctive en tant que purgatif de la part des chiens et des chats[33], en outre, il est considéré comme diurétique anti-inflammatoire, décongestionnant des voies urinaires et conseillé en cas de lithiases (rénales ou biliaires) [29][20] [33] grâce aux sels de potassium et à l'huile essentielle qu'il contient.

Il est d'un grand secoure dans les cas de colique néphrétique surtout si on commence la cure dès les premiers symptômes de la crise.
Il est conseillé dans le traitement du Diabète et le Rhumatisme[42].

1-1/ Classification d'espèce :

D'après la bibliographie on note cette classification [35] :

- Division : Spermatophytes
- Subdivision : Angiospermes
- Classe : Cotylédonées
- Ordre : Glumiflores
- Famille : poaceae
- Genre : Cynodon
- Espèce : Cynodon Dactylon

1-2/ Description :

C'est une plante vivace à rhizome longuement rampant sur la surface du sol environ de 20m de long, elle est très ramifiée portant de nombreuses feuilles dressées à longue gaine entourant la tige et a limbe aplatie 2.5-20cm de long. [20][17]

L'inflorescence composée de 2 à 6 épis digités, droits, purpurins ou verts à rachis villeux au mois à la base, disposés sur deux rangs serrés, en épis paraissant dentée 50mm de long au plus, la période de la floraison s'étend du mois février jusqu'en novembre. [42][20][43][3]

1-3/ Composition chimique :

d'après les études de « Miller 1958 » on constate que 100 g de la plante séchée à l'abri du soleil contient [20]:

* Protéine	→ 11,6 g
* Graisse	→ 2,1 g
* Total de carbohydate	→ 75,9 g
* Fibre	→ 25,9 g
* Cendre	→ 10,4 g
* Ca	→ 530 g
* P	→ 220 mg
* Fe	→ 112,0 mg
* K	→ 1630mg
* Equivalant du β -carotène	→ 28 μ g

comme elle contient la « cynodine », des acides cyanhydriques et la triticine, en plus des sucres et une essence antibiotique[29] [20][33].

1-4/ Usages :

C'est une plante résistante maintient sa verdure pendant le temps chaud pour cette raison il est considéré comme un pâturage précieux et herbe de fourrage excellent, Il peut grandir dans des sols humides, supporter la sécheresse et aussi il a une tendance d'éliminer d'autres plantes.

Un pâturage pour chevaux et bétail, Il est précieux pour conservation du sol dû à ses longs coureurs qui enracinent aux nœuds. Il est difficile d'extirper et peut devenir une mauvaise herbe dans les terres cultivée. Dans certain régions elle est utilisée comme pelouse et gazon, et dans les îles de Hawaii il est considéré comme un excellent gazon [20].

1-5/ Mode de multiplication :

Il existe deux types de multiplication :

- par graines.
- par graines et organe végétale.

Pour le premier type il faut signaler que les mauvaises herbes ont un pouvoir de productivité des graines très important, par exemple pour « le folle avoine » produit de 250 à 500 graine par plante.

La multiplication par graines est complétée chez certaines espèces par la reproduction et la dissémination d'organes végétatifs appropriés et le chiendent est parmi les plants qui se multiplie par les graines plus le bourgeonnement des tiges.[40]

CHAPITRE II :

Matériels et Méthodes

1 / PRESENTATION DE LA REGION D'ETUDE

L'espèce a été récoltée le 02/12/99 dans l'une des exploitations de la région de Ouargla situé à trois kilomètres Nord-Est de la ville de Ouargla, qui s'étend sur une superficie de 360 m², elle comprend 60 palmiers plus les rejets des palmiers présentent les différents espèces, l'irrigation du périmètre se fait à partir d'un forage équipé d'une pompe immergée, la superficie est irriguée en deux heures de temps dans la semaine.

L'analyse des flavonoides s'effectue généralement sur les différents organes de la plante « feuille, tige, racine » et d'après la bibliographie les parties chlorophylliennes étroitement liée au facteur de lumière sont la base de biogenèse des flavonoides.

L'espèce est présentée dans la figure I-1.

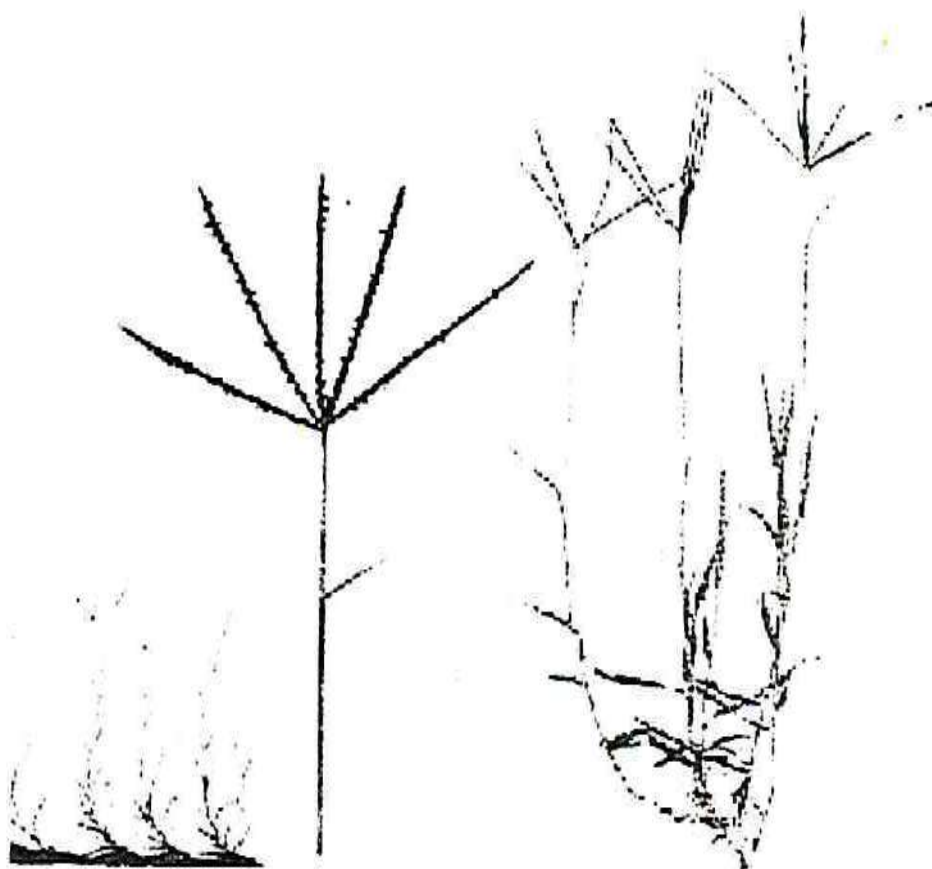


FIG II-1 : *CHIENDENT*

1-1/ Séchage :

La plante est séchée dans une étuve, à une température de 80°C (car les flavonoides ne se dégradent pas à cette température) pendant 03 jours avec un brassage pour avoir un séchage homogène. Après le séchage des différentes parties de la plante plus le broyage la poudre est entreposée à l'abri de la lumière dans des récipients en verre fumé propres et secs, fermés par des couvercles hermétiques suivant la méthode de M.PENELOPE Ody 1995 [39] .

1-2/ Tests chimiques :

On procède aux différents tests chimiques de présence ou d'absence des différents principes actifs sur les différentes parties de la plante (feuille, tige, racine) [36][41]:

1-2-1/ Tests des Huiles essentielles :

On prend 50g de chaque parties de la matière végétale en poudre séchée à l'abri de la température, en les mettant dans 03 récipients en ajoutant 250-300 ml d'eau distillée, après le filtrat est extrait par le diéthyle éther, ensuite la phase étherée est filtrée avec l'ajout de Na_2SO_4 non hydraté et puis l'éther est évaporé à une faible température, le résidu est dissous dans l'eau en laissant la solution jusqu'à l'apparition d'une couche jaune sur la surface de l'eau cela indique la présence des huiles essentielles.

1-2-2/ Test des Cardénolides :

A/ Test de tedrose :

On prend 01 g de poudre de chaque parties de la matière végétale, macérées dans 20 ml d'eau distillée et filtrée.

10 ml du filtrat est extrait avec 10 ml d'un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, on évapore la phase organique ensuite le précipité est dissout dans 3 ml d'acide acétique glacial, après l'ajout de quelques gouttes de FeCl_3 puis de 1 ml d' H_2SO_4 on remarque l'apparition de la couleur vert-bleu dans la phase acide indiquant la présence des cardénolides.

B/ Test de trichlorure d'antimonié :

10g de chaque partie de la plante et extraite avec de l'alcool éthylique 70%, l'extrait alcoolique évaporé à basse pression dans un bain-marie, puis on chauffe une petite quantité de résidu avec le réactif de trichlorure

d'antimonié, l'absence de la couleur mauve foncée indique l'absence des cardenolides.

1-2-3/ Tests des Saponosides :

On prend 2g de poudre sèche de chaque partie, chauffée dans 80 ml d'eau distillée, après filtration et refroidissement, la solution est agitée l'apparition d'une mousse indique la présence des saponosides.

1-2-4/ Tests des Tanins :

10g de matière végétale sèche (les trois parties) est extraite avec de l'alcool éthylique 50%, après filtration on procède au test du filtrat avec des gouttes de FeCl_3 , l'apparition de la couleur verte indique la présence des tanins.

1-2-5/ Tests des Stérols insaturés et Terpènes :

On prend 5g de chaque partie de la plante sèche (poudre), la dissoudre dans 20 ml de CHCl_3 , après filtration on ajoute au filtrat 1 ml de H_2SO_4 avec précaution sur les parois du tube, l'apparition de la couleur verte se transformant après en rouge ou point d'intersection des deux phases indique la présence des stérols insaturés et les triterpènes.

1-2-6/ Tests des Alcaloïdes :

10g de poudre de chaque partie de la plante sèche, extraite avec 50 ml de HCl dilué l'extrait est basifié avec NH_3 puis le mélange est extrait avec CHCl_3 , (3* 20 ml), la phase organique est évaporée, puis on dissout le précipité dans 2 ml de HCl dilué, on ajoute à la solution acide trois gouttes du réactif de Mayer, l'apparition d'un précipité blanc indique la présence des Alcaloïdes.

1-2-7/ Tests des Flavonoides :

On a plusieurs classe des composés hétérocycliques oxygénés et pour tester une famille de ces composés appelés flavonoides on procède comme suit :

10g de la matière sèche des trois parties de la plante, macérées dans 150 ml de HCl 1% pendant une nuit, après filtration on procède aux tests suivants :

On prend 10 ml de filtrat on le rend basique par NH_4OH , la coloration jaune claire indique la présence des flavonoides.

1-2-7-a/ tests des flavonoides libres (les aglycones) :

A 5 ml de filtrat on ajoute 2.5 ml d'alcool amylique, si la phase alcoolique se colore en jaune cela indique la présence des composés flavoniques libres.

1-2-7-b/ test des glycosides flavoniques :

1 / évaporer la phase aqueuse du test des aglycones sous vide et puis le précipité est dissout dans 3 ml de HCl en chauffant légèrement, après refroidissement on ajoute 2.5 ml d'alcool amylique, l'apparition de la couleur jaune indique l'existence des hétérosides flavonique .

2 / ou ajoute une petite quantité de Mg à l'extrait acide, l'absence de la couleur rouge indique la non existence des glycosides flavoniques.

*** Résultats des tests chimiques :**

Parties de la plante Tests chimique	Feuilles	Racines	Tiges
Flavonoides	+++	++	+
Aglycones :	+++	++	+
Glycosides :	+++	+	++
Alcaloïdes	+	++	+++
Saponosides	-	-	-
Cardénolides	+	-	-
Tanins	+++	+	++
Stérols insaturés et terpènes	++	+	+++
Huiles essentielles	+	+	+

2 / Extraction et dosage des composés flavoniques

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les différents types des flavonoides :

1. Extraction avec un mélange eau méthanol 70%.
2. Extraction avec la méthode de "LEBRON et col 1967".
3. Extraction avec de l'acétone.
4. Extraction des hétérosides avec de l'éthanol 70%. « HARBONE 1973 »

Dans notre étude on se basera sur des méthodes universelles afin d'obtenir une séparation très spécifique des différentes classes des flavonoides :

- Extraction des aglycones, anthocyanidines et les c-glycosylflavones avec l'hydrolyse acide de la plante « LEBRETON et col 1967 ».
- Extraction des hétérosides avec l'éthanol 70% « HARBORNE 1973 ».

2-1/ Extraction des aglycones, des anthocyanidines et des c-glycosylflavones.

La méthode d'extraction d'après (LEBRETON et col 1967) se base sur l'hydrolyse acide des hétérosides de la matière végétale,

Après la récolte et le séchage de la plante et une fois réduite en poudre sèche, 1g de cette dernière subit séparément une hydrolyse dans 80 ml de HCl 2N au bain-marie bouillant pendant 40 min avec insufflation d'air toutes les 10 min, l'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes, après refroidissement, le mélange est filtré pour éliminer toutes les traces de la poudre végétale, puis on extrait les aglycones flavoniques trois fois par l'éther éthylique, la phase étherée est évaporée à l'air libre, puis le résidu est repris par 5-10 ml d'éthanol .

Une partie de cet extrait est utilisé pour l'identification des aglycones en utilisant différentes méthodes chromatographiques, pour le qui est de deuxième partie on procède à un dosage différentiel par le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 420 nm.

En mesurant le volume total de la phase aqueuse puis on procède à un dosage des anthocyanes à 520 nm, cette phase est ensuite extraite par n-butanol, après on réalise un dosage des c-glycosylflavones à 340 nm, concentré la phase précédente par affrontement avec HCl 2N jusqu'à obtention de 2 à 3 ml, ce volume est utilisé pour identifier les anthocyanes et les c-glycosylflavones par les différentes méthodes chromatographiques (CP, CCM, CC, HPLC, CPG etc.....). {schéma II-1}

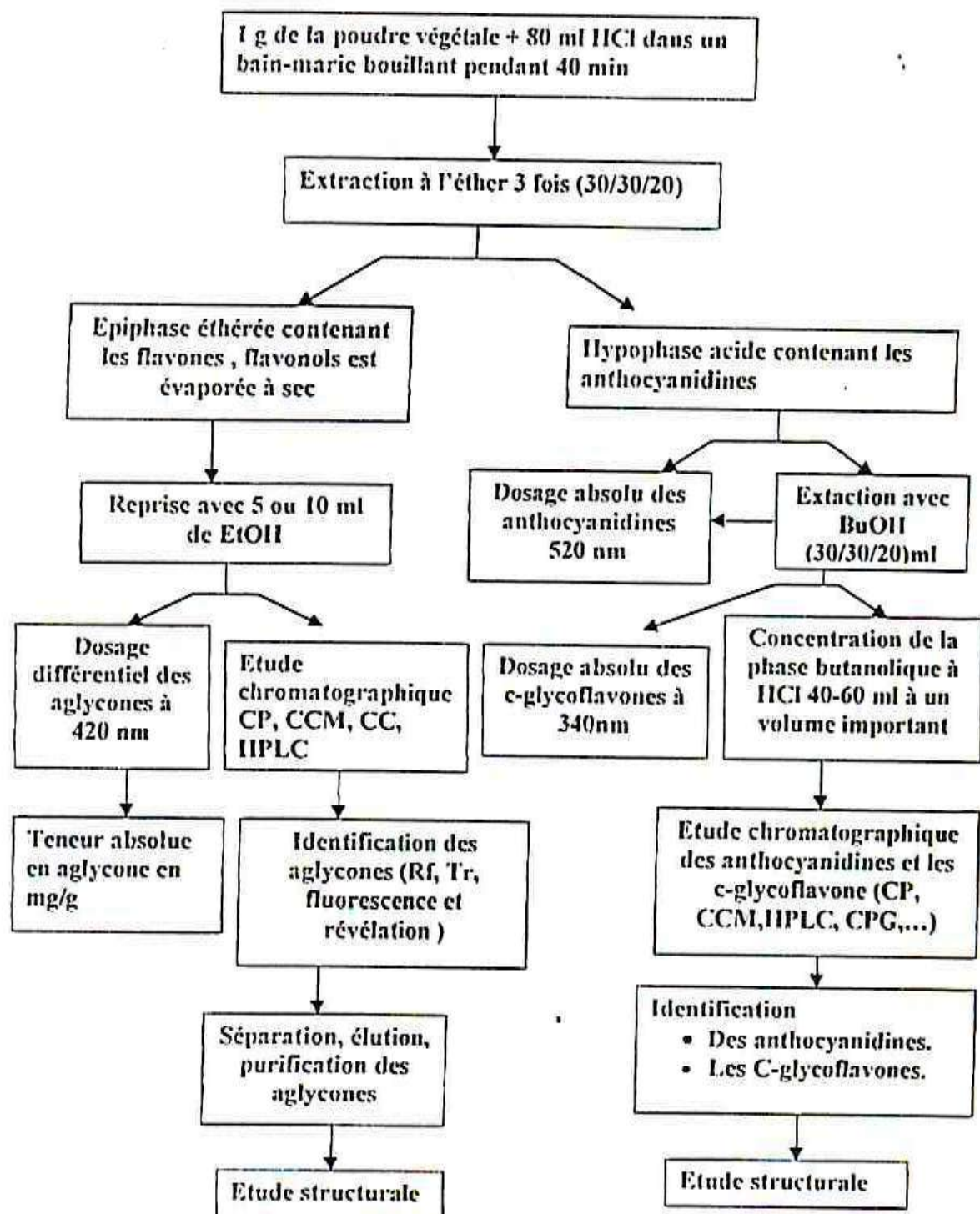
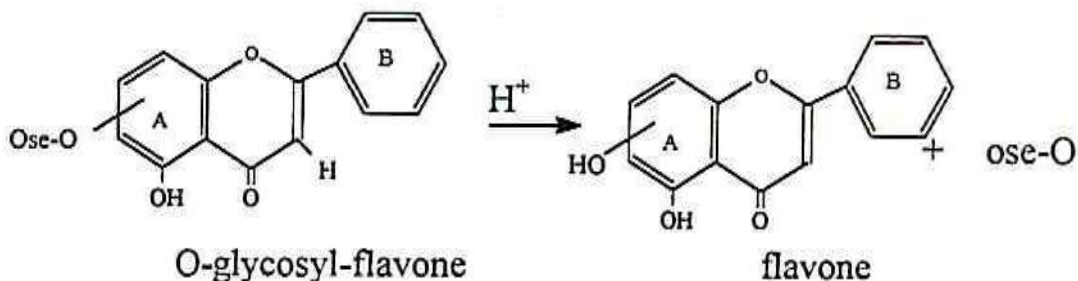


Schéma II-1 : Extraction, identification et dosage des Aglycones, Anthocyanidines et les C-glycosylflavones.

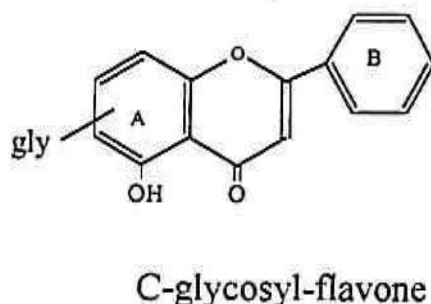
A/ Les Aglycones :

Obtenus lors de l'hydrolyse acide de la matière végétale par rupture des liaisons osidiques des composés hétérosidiques natifs selon le schéma suivant [7][23].



B/ Les C-glycosylflavones :

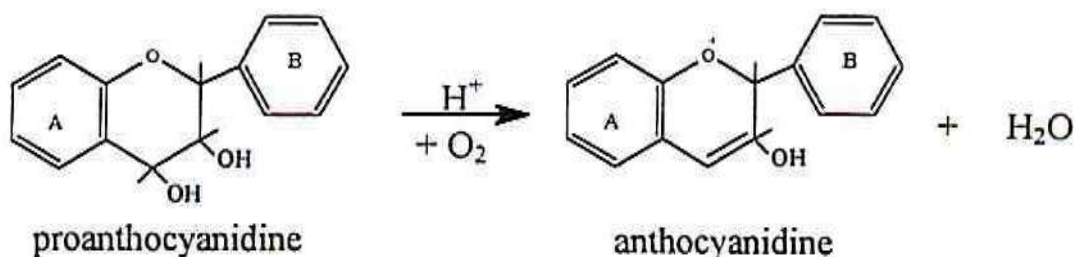
sont des hétérosides ou le sucre est directement attachée au noyau aromatique comme suit.



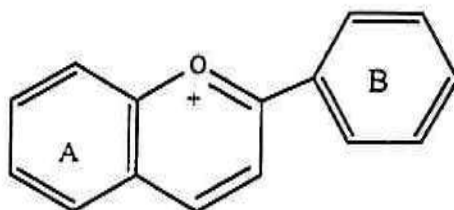
Ce sont des composés non hydrolysée, mais éventuellement isomerisés (isomérisation 6 – 8).

C/ Les Anthocyanidines (aglycones des anthocyanes) :

se sont le résultat de l'oxydation des proanthocyanidines correspondant selon le schéma suivant :



Ils sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange, la structure de base des anthocyanes est la flavylum (2-phenyl-1-benzopyrylium) [1][7].



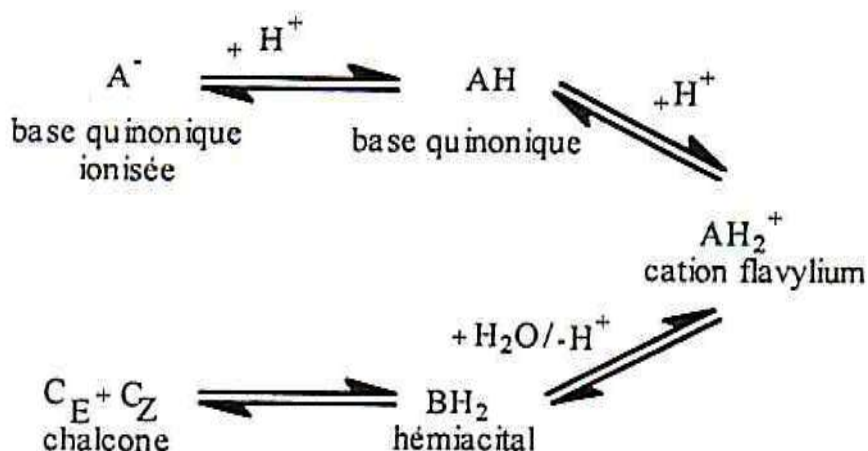
le cation flavylum

Leur présence dans les plantes est détectable à l'œil nu, les anthocyanes sont glycosylés le plus souvent en position 3 et 5, les sucres les plus fréquents étant des mono-saccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose), les di et tri-saccharides forment par combinaison des mono-saccharides précédents [12] .

L'aglycone de l'anthocyane « anthocyanidine » est caractérisée par deux bandes d'absorption, dont une bande intense dans le domaine du visible [6]. On trouve les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines [25].

* Effet du pH sur les anthocyanes :

Le pH est le premier facteur influant sur la couleur des anthocyanes particulièrement sur la structure de ces composés, en outre la couleur d'une solution aqueuse d'anthocyane montre la coloration rouge à pH très acide, cette couleur disparaît avec l'augmentation de pH, la solution neutre des anthocyanes à une couleur bleue qui décolore rapidement, ce changement de couleur est du à des équilibres chimiques entre les différentes formes que peut prendre l'anthocyane selon le mécanisme proposé par Brouillard [14][19][30][38] :



Après l'extraction on a effectué un dosage des classes flavoniques comme suit :

2-2/ Dosage des composés flavoniques :

Il est préférable de commencer par le calcul de la teneur d'anthocyane car ce dernier se dégrade rapidement à la lumière comparativement aux aglycones.

A / Dosage des Anthocyanes :

La teneur en anthocyane est donnée par la formule suivante :

$$T(\text{mg/g}) = \eta (D.O / \epsilon) * M * V * (d/P)$$

η = 6 facteur correctif tenant compte du rendement de transformation des proanthocyanidines en anthocyanidines équivalent.

DO : densité optique à la longueur d'onde maximale comprise entre 515 et 540 nm dans la phase aqueuse

ϵ = 34700 coefficient d'absorption molaire de la cyanidine

M = 306 : masse molaire de la procyanidine.

V : volume de la phase aqueuse mesuré après l'hydrolyse.

d : facteur de dilution ici égale à 1.

P = 1g poids sec de matière végétale.

Soit :

$$T(\text{mg/g}) = 5.2 * 10^{-2} * D.O * (V/P) * d$$

B / Dosage des aglycones :

la teneur en aglycones flavoniques exprimée en quercétine (flavonol) est calculée par la formule suivant [23][24] :

$$T(\text{mg/g}) = (\Delta(D.O) / \epsilon) * M * (V/P) * d$$

$\Delta(D.O)$: densité optique du pic différentiel $\{D.O_{Al^{3+}} - D.O_{EtOH}\}$

- $D.O_{Al^{3+}}$ densité optique des aglycones dans la solution $AlCl_3$ 1% dans EtOH
- $D.O_{EtOH}$ densité optique des aglycones dans une solution éthanolique.

ϵ : coefficient d'absorption molaire de la quercétine égal à 23.00 au pic différentiel.

$M = 302$ g/mol masse molaire de la quercétine.

V : volume de la phase éthanolique des aglycones.

d : facteur de dilution égale 6.

$P = 1$ g poids sec de la matière végétale hydrolysée.

Soit :

$$T(mg/g) = 1.3 \cdot 10^2 \cdot \Delta(D.O) \cdot (V/P) \cdot d$$

C./ Dosage des c- glycoflavones :

La teneur des c-glycoflavones est calculée par la formule suivant :

$$T(mg/g) = (D.O/\epsilon) \cdot M \cdot (V/P) \cdot d$$

DO : densité optique à la longueur d'onde maximale 340nm

$\epsilon = 18.850$ c'est le coefficient d'absorption de l'orientine.

$M = 448$ g/mol masse molaire de l'orientine.

V : volume de la phase butanolique mesuré après l'hydrolyse.

d : facteur de dilution ici égale à 1.

$P = 1$ g poids sec de matière végétale.

Soit :

$$T(mg/g) = 2.5 \cdot 10^2 \cdot D.O \cdot (V/P) \cdot d$$

2-2-1/ Matériels et Appareillages :

A/ appareillage : nous avons effectué le dosage des classes flavoniques avec le spectrophotomètre U.V de type UNICAM.

B/ Matériels utilisés :

- 1/ Une cuve en quartz de 1cm x4 cm.
- 2/ Ethanol pour l'extrait des aglycones.
- 3/ Méthanol pour l'extrait des anthocyanes et celle des c-glycosides.

2-2-2/ Résultats et Discussions :

* Teneur des composés flavoniques dans chaque organe :

Nous avons essayé de doser les différentes classes des flavonoides dans trois échantillons et on a regroupé Les résultats dans les tableaux II- (2, 3, 4, 5) suivant :

A -1/ Teneur en aglycones

TABLEAU II-1 : Teneur en aglycones dans les différentes parties

<i>L'ORGANE</i> <i>ECHANTILLON</i>	<i>Feuille</i> <i>(mg/g)</i>	<i>Tige</i> <i>(mg/g)</i>	<i>Racine</i> <i>(mg/g)</i>
<i>I</i>	0,21	0,078	0,195
<i>II</i>	0,37	0,05	0,123
<i>III</i>	0,24	0,142	0,158
<i>La moyenne</i>	0,274	0,09	0,16
<i>L'écart type</i>	0,07	0,037	0,029
<i>Coefficient de dispersion</i>	25%	41 %	18%

A-2/ Interprétation :

D'après le tableau II-2 on remarque que la partie la plus riche en aglycones ce sont les feuilles, la teneur varie de 0.09 à 0.274.

Nous avons noté que la teneur différentielle en aglycones est égale à :

- 0.274 ± 0.07 mg/g pour les feuilles.
- 0.09 ± 0.037 mg/g pour les tiges
- 0.16 ± 0.029 mg/g pour les racines.

Les coefficients de dispersion sont respectivement 25%, 41% et 18%.

Comme on a pu remarquer que les racines sont classés avant les tiges même elles ne sont pas une partie chlorophyllique.

Nous notons une dispersion moyenne des valeurs de teneur dans les feuilles et les racines de 18% à 25% et une forte dispersion des valeurs de teneur dans les tiges égale à 41%.

Ces résultats nous permettent de dire que les feuilles sont la partie la plus riche en aglycones flavoniques.

B-1/ Teneur en anthocyanes

TABLEAU II-2 : Teneur en anthocyanes dans les différentes parties

L'ORGANE ECHANTILLON	Feuille (mg/g)	Tige (mg/g)	Racine (mg/g)
	HCl 2N	HCl 2N	HCl 2N
I	1,85	1,16	0,271
II	0,79	0,56	0,24
III	1,503	1,25	0,41
La moyenne	1,381	0,99	0,307
L'écart type	0,44	0,306	0,074
Coefficient de dispersion	31 %	30 %	24%

B-2 /Interprétation :

On note que les feuilles sont la partie la plus riche en anthocyanes avec une teneur absolue varié de 0.79 à 1.85mg/g avec une moyenne de 1.381 ± 0.44 mg/g et de 0.56 à 1.25 mg/g avec une moyenne de 0.99 ± 0.306 mg/g dans les tiges et de 0.585 à 1.047 mg/g avec une moyenne de 0.307 ± 0.074 mg/g pour les racines.

D'après les valeurs moyennes on remarque qu'il existe une différence entre la partie souterraine et la partie aérienne de 0.307 à 1.381mg/g .

Le coefficient de dispersion varié de 24 % à 31% où on remarque une dispersion moyenne des valeurs de teneur dans les trois organes, comme on constate que les anthocyanes sont localisés dans les parties aériennes plus que les racines surtout dans des feuilles car les anthocyanes d'après le Dr. Majeed R. et col sont les pigments protecteurs des organes internes de la plante contre la lumière.

C-1/ Teneur en c-glycoflavones

TABLEAU II-3 : Teneur en c-glycosides dans les différentes parties

L'ORGANE ECHANTILLON	Feuille (mg/g)	Tige (mg/g)	Racine (mg/g)
	BuOH	BuOH	BuOH
I	9,003	7,916	7,310
II	7,927	8,629	8,479
III	7,244	5,853	7,058
La moyenne	8,058	7,466	7,61
L'écart type	0,724	1,177	0,62
Coefficient de dispersion	8%	15%	8 %

C-2/ Interprétation :

* La teneur en C-glycosides dans les feuilles varient de 7.244 à 9.003 mg/g avec une moyenne de 8.058 ± 0.724 mg/g.

* Dans les tiges allant de 5.853 à 8.629 mg/g avec une moyenne de 7.644 ± 1.177 mg/g.

* la teneur dans les racines allant de 7.058 à 8.479 mg/g avec une moyenne de 7.61 ± 0.62 mg/g.

On constate que les feuilles sont la partie la plus riche en C-glycosides puis les racines et les tiges en dernier lieu, les coefficients de dispersions sont respectivement 8 %, 8 %, 15 % donc la dispersion est faible.

D-1/ Teneur des classes flavoniques dans les trois parties

TABLEAU II-4 : Rassemble les variations de la teneur des composés flavoniques dans les trois parties de la plante

<i>PARTIE \ TENEUR</i>	<i>Teneur en aglycones (mg/g)</i>	<i>Teneur en anthocyanes (mg/g)</i>	<i>Teneur en C-glycoflavones (mg/g)</i>
<i>Feuille</i>	0,274	1,381	8,058
<i>Tige</i>	0,09	0,99	7,466
<i>Racine</i>	0,16	0,307	7,61
<i>La moyenne</i>	0,175	0,893	7,711
<i>L'écart type</i>	0,076	0,444	0,252
<i>Coefficient de dispersion</i>	43%	49%	3%

D-2/Interprétation :

D'après le tableau II-5 on constate que la teneur en aglycones est faible par rapport a celle des anthocyanes et les c-glycosides, et la teneur la plus grande est celle des c-glycosides, la teneur moyenne de chaque classes flavoniques est comme suit :

- La teneur en aglycones dans les trois parties est égale à $0,175 \pm 0,076 \text{ mg/g}$,
- La teneur en anthocyanes égale à $0,893 \pm 0,444 \text{ mg/g}$,
- La teneur en c-glycosides est égale à $7,711 \pm 0,52 \text{ mg/g}$

Les coefficients de dispersions sont respectivement égale à 43%, 49% et 3%, d'après ces coefficient on peut dire que la teneur des c-glycosides dans toutes les parties est presque la même par contre la teneur en aglycones et en anthocyanes varie d'une partie à une autre.

2-2-3/ Conclusion :

A la fin de cette étude quantitative des différentes classes flavoniques au sein des parties de chiendent on peut estimer que les feuilles sont la partie la plus riche en composés flavoniques.

D'après DELAVEU la teneur des flavonoides s'accroît dans le même sens que la masse de matière végétale, en effet la synthèse des flavonoides dépend de la photosynthèse et par voie de conséquence est fonction de la surface exposée à la lumière.

D'autant plus que le dosage de ces classes nous amène à conclure que la partie prédominante se sont les c-glycosides « les hétérosides », en accord avec le fait que la plupart des composés phénoliques sont sous forme des hétérosides ou des esters dans les plantes.

2-3/ Extraction des hétérosides :

On prend 2.5g de la matière végétale on procède a sa macération dans 250 ml l'éthanol 70% pendant 48 heures, on filtre la phase alcoolique on procédant à une deuxième macération de la poudre végétale pendant quelques minutes par 100ml d'éthanol, les phases alcooliques réunies des deux filtrations sont évaporées à sec au rota-vapeur, le résidu sec est repris par 100 ml d'eau bouillante et après refroidissement les hétérosides sont extraits par 100 ml de n-butanol. Puis la phase butanolique est évaporée à sac et le résidu sec est repris par 5 ml de méthanol [23][24].

La phase méthanolique contenant les o-glycosides et les c-glycosides subi une analyse chromatographique et structurale (schéma II-2)

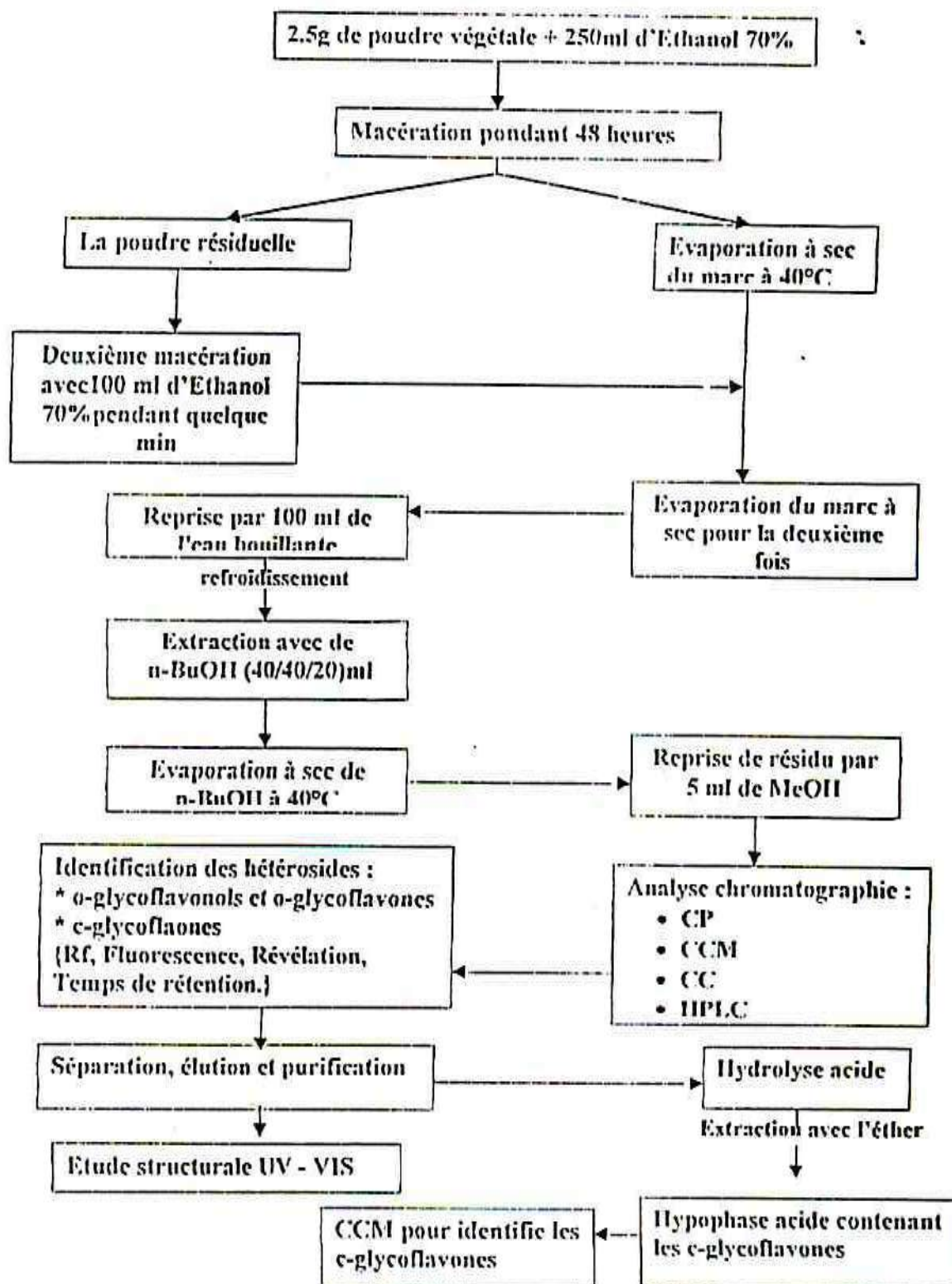


Schéma II-2 : les étapes d'extraction et d'identification des hétérosides 31

Afin d'avoir la composition chimique des extraits nous avons procédé à une analyse chromatographique « CP, CCM, CC, HPLC, CPG » et spectrale UV.

3 / Analyse Chromatographique :

Après l'obtention des extraits on constate une séparation avec différentes techniques chromatographiques {CP, CCM, CC, HPLC, CPG}.

3-1/ La séparation sur papier et sur couche mince :

D'après Raphaël Ikan 1969[8] la chromatographie sur papier a été utilisée pour la première fois par Bate-Smith en 1948.

Cette technique ne nous donne pas une identification structurale mais une idée sur la composition flavonique des extraits comme la classe chimique, le nombre des composées existants :

Résolution frontale : (Le facteur de rétention)

varie avec la variation des conditions de séparation (le solvant d'élution et le support), il est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = d \text{ soluté} / d \text{ solvant}$$

d soluté : Distance parcourue par le composé.

d solvant : Distance parcourue par le solvant entre le dépôt et le front de ce solvant.

Après avoir calculé les R_f on les comparent à ceux des témoins en se basant sur des données bibliographiques, on remarque qu'il y a une relation étroite entre les vitesses des composés et le nombre de substitutions (OH, OMe, glycosides), par exemple l'augmentation du nombre des OH diminue la mobilité des composés flavoniques donc la valeur des R_f diminue et l'augmentation des groupements méthoxyles (OMe) entraîne une augmentation des R_f [5][23], sachant que la polarité des solvants influe sur la séparation des flavonoïdes dans le cas des aglycones des flavonols, les chalcones, et les aurones on peut les séparer par des solvants apolaires mais les flavonol-3-glycosides, flavanones catechins etc.... perd sa mobilité dans les solvants aqueux [5].

La fluorescence :

Chaque composé flavonique ou chaque classe est caractérisé par une couleur spécifique sous la lampe UV, visible ou en présence d'un réactif, le tableau suivant nous donne les couleurs des différents types flavoniques[5].

TABLEAU II-5: Couleurs des flavonoides avec ou sans réactifs

<i>Réactif</i>	<i>La source</i>	<i>La couleur</i>	<i>La classe des flavonoides</i>
Aucun réagent	Visible	Orange, mauve Jaune brillée Jaune clair	Anthocyanes Chalcones, auronnes Flavones
	UV 253 nm	Une absorption noire	Iso flavones, flavone
	UV 300 nm	Marron faible	Flavonol-3-glycosides, flavones
		Jaune brillée	Flavonol avec groupe 3-OH libre
		Jaune vert	Flavonol sons OH à la position (5)
	UV	La couleur bleue Mauve	3,5-methoxy flavonols l'absence des OH libre on position 3
Les vapeurs de NH ₃	UV	Changement de couleur	la plupart des flavonoides
Borohydrate de sodium - AlCl ₃ éthanolique	Visible	Rouge	flavanones
Acide p-toluène sulfonique	Visible	Rouge ou orange (après le chauffage pendant 10 min à température 105 °C)	flavan-3,4-diol
2,4,6-trinirophenol dans éthanol ou KOH éthanolique	Visible	Rouge	Flavan-3-ols (types catechine)

Au cours de l'hydrolyse acide et de l'extraction alcoolique de différentes classes flavoniques il y a d'autres composés qui passent dans les extraits telle que les acides phénols et la chlorophylle [23].

1/ les acides phénols :

Sont des composés solubles dans les acides et l'éther, ils peuvent passer dans l'extrait des aglycones flavoniques lors de l'extraction, ils ont une fluorescence bleue aux UV.

2/ les chlorophylles :

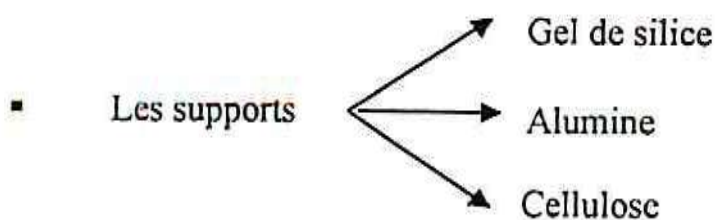
Les chlorophylles sont solubles dans l'éther et les alcools mais l'hydrolyse acide peut dégrader ces substances, ils présentent le plus haut Rf sur le chromatogramme et ils ont une fluorescence bleu-vert à la lumière du jour et rouge-rose en UV.

3-1-1/ Les conditions de séparation pour les classes flavoniques :

On a remarqué que l'analyse chromatographique sur papier « W » ne donne pas une bonne séparation pour les différentes classes des flavononiques avec les conditions appliquées :

- Acétate d'éthyle ; Méthanol ; Eau 10/1.5/1.
- n Butanol ; Acide acétique ; Eau 6.5/0.5/3.
- Toluène ; Méthanol ; Acétone ; Butanol 30/20/15/0.3.
- Butanol ; Eau ; Ethanol ; Ammoniaque 20/15/5.75/0.5.
- Dichloro méthane ; Méthanol 95/5.
- Dichloro éthane ; Ethanol 95/5.

Pour la séparation sur couche mince on a procédé à une séparation mono-dimensionnelle dans une cuve à chromatographie avec les différents types de supports (phase stationnaire ϕ_s) et plusieurs types de solvants (phase mobile ϕ_m) sont :



- les solvants d'élutions pour les aglycones sont :
 - 1/ dichloro méthane, méthanol (95/5)
 - 2/ dichloro éthane, éthanol (95/5)

- les solvants d'élution pour les anthocyanes et les hétérosides sont [23][24]:

<i>Solvants d'élution</i>	<i>Proportions</i>
Acétate d'éthyle ; Méthanol ; Eau	10/1.5/1
n Butanol ; Acide acétique ; Eau	6.5/0.5/3
Toluène ;Méthanol ; Acétone ; Butanol	30/20/15/0.3
Butanol ; Eau ; Ethanol ; Ammoniaque	20/15/5.75/0.5
Dichloro méthane ; Méthanol	95/5
Dichloro éthane ; Ethanol	95/5

Nous avons trouvé que les conditions adéquates pour une séparation mono dimensionnelle des aglycones sont les plaques commerciales de gel de silice 60 de 10*10 cm avec une épaisseur de 0.375 mm, la phase mobile est le mélange de dichloro éthane avec l'éthanol (95/5).

Pour les anthocyanes et les hétérosides la meilleure séparation (mono dimensionnelle) a été obtenue sur gel de silice avec les même dimensions avec la phase mobile Acétate d'éthyle, méthanol, eau (10/1.5/1).

La révélation a été faite sous la lampe U.V à deux longueurs d'ondes :

- o les aglycones sont révéle à $\lambda = 254$ nm et 366 nm
- c les anthocyanes et les hétérosides $\lambda = 366$ nm

3-1-2/ Résultats et Discussions :

1/ Nous avons effectué une séparation mono dimensionnelle sur plusieurs phases stationnaires avec des différentes phases mobiles dans le but d'avoir les conditions adéquates pour séparer les aglycones de même pour les anthocyanes et les hétérosides.

** L'extrait des aglycones :*

TABLEAU II-6 : Rf des composés séparés sur gel de silice

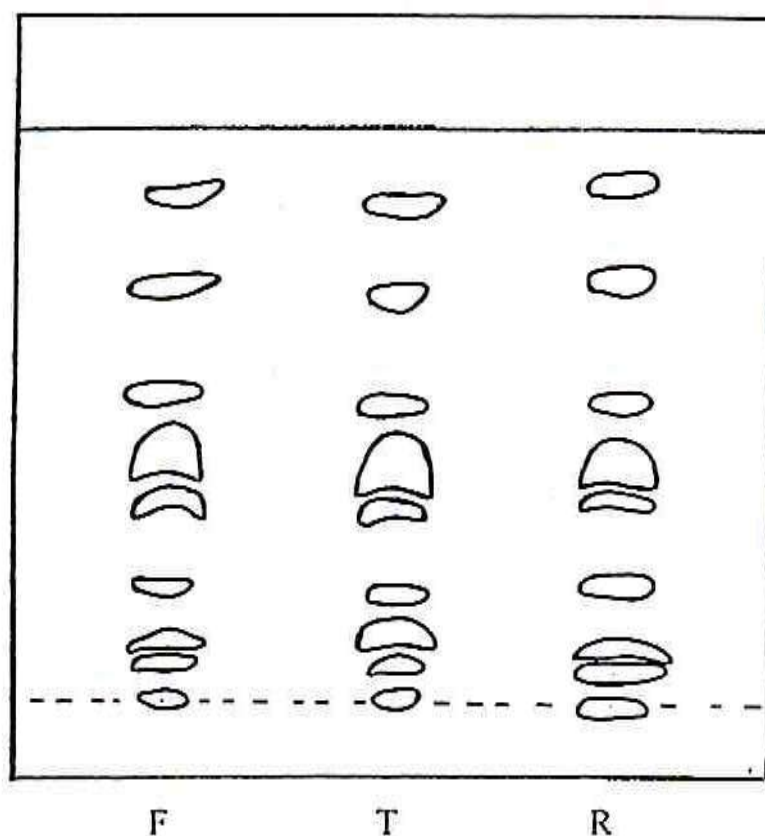
<i>CH₂Cl₂/MeOH (95/5)</i>				<i>C₂H₄Cl₂/EtOH (95/5)</i>			
<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>	<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>
<i>Jaune</i>	0,71	0,72	0,7	<i>Mauve</i>	0,90	0,88	0,92
<i>J-Vert</i>	0,64	0,63	0,61	<i>J-Vert</i>	0,72	0,71	0,73
<i>Mauve</i>	0,55	0,56	0,54	<i>Jaune</i>	0,53	0,51	0,52
<i>Jaune</i>	0,20	0,23	0,19	<i>Mauve</i>	0,41	0,39	0,42
<i>Bleu</i>	0,16	0,17	0,14	<i>Jaune</i>	0,36	0,34	0,33
<i>Jaune</i>	0,11	0,11	0,10	<i>orange</i>	0,20	0,19	0,21
<i>Mauve</i>	0,08	0,08	0,08	<i>Bleu</i>	0,11	0,12	0,10
<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00	<i>J-brillée</i>	0,07	0,07	0,05
				<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00

TABLEAU II-7: Rf des composés séparés sur alumine

<i>CH₂Cl₂/MeOH</i>				<i>C₂H₄Cl₂/EtOH</i>			
<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>	<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>
<i>Jaune</i>	0,93	0,94	0,94	<i>Mauve</i>	0,90	0,94	0,92
<i>Mauve</i>	0,51	0,54	0,50	<i>Jaune</i>	0,10	0,14	0,12
<i>B-clair</i>	0,40	0,42	0,38	<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00
<i>J-Vert</i>	0,33	0,32	0,31				
<i>B-Vert</i>	0,20	0,24	0,18				
<i>Mauve</i>	0,09	0,12	0,11				
<i>Jaune</i>	0,00	0,00	0,00				

TABLEAU II-8 : Rf des composés séparés sur cellulose

<i>CH₂Cl₂/MeOH</i>				<i>C₂H₄Cl₂/EtOH</i>			
<i>couleur</i>	<i>Rf</i> <i>feuille</i>	<i>Rf</i> <i>tige</i>	<i>Rf</i> <i>racine</i>	<i>couleur</i>	<i>Rf</i> <i>feuille</i>	<i>Rf</i> <i>tige</i>	<i>Rf</i> <i>racine</i>
<i>Marron</i> <i>au forant</i>	1,00	1,00	1,00	<i>Marron</i>	0,94	0,98	1,00
				<i>Bleu</i>	0,08	0,094	0,094



F : feuilles
 T : tiges
 R : racines

FIG II-2 : Résultats de CCM d'extrait des aglycones
 Phase stationnaire : gel de silice
 Phase mobile : $C_2H_4Cl_2$ / EtOH (95/5)

* L'extrait des anthocyanes :

TABLEAU II-9: Rf des composés séparés sur les différents types de phases stationnaires.

EtOAc/MeOH/H ₂ O (10/1.5/1)											
Gel de silice				Alumine				Cellulose			
couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine	couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine	couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine
Marron	-	0,96	0,89	J-orange	0,94	0,95	0,94	Marron	0,99	0,98	0,99
Mauve	0,80	0,83	0,82	J-clair	0,28	-	-	Marron	0,00	0,00	0,00
Jaune	-	-	0,75								
Bleu	0,65	-	0,63								
J-vert	-	0,52	0,50								
J-pale	0,32	-	0,33								
Vert	0,25	-	-								
Bleu	0,06	0,07	0,06								
J-vert	0,00	0,00	0,00								

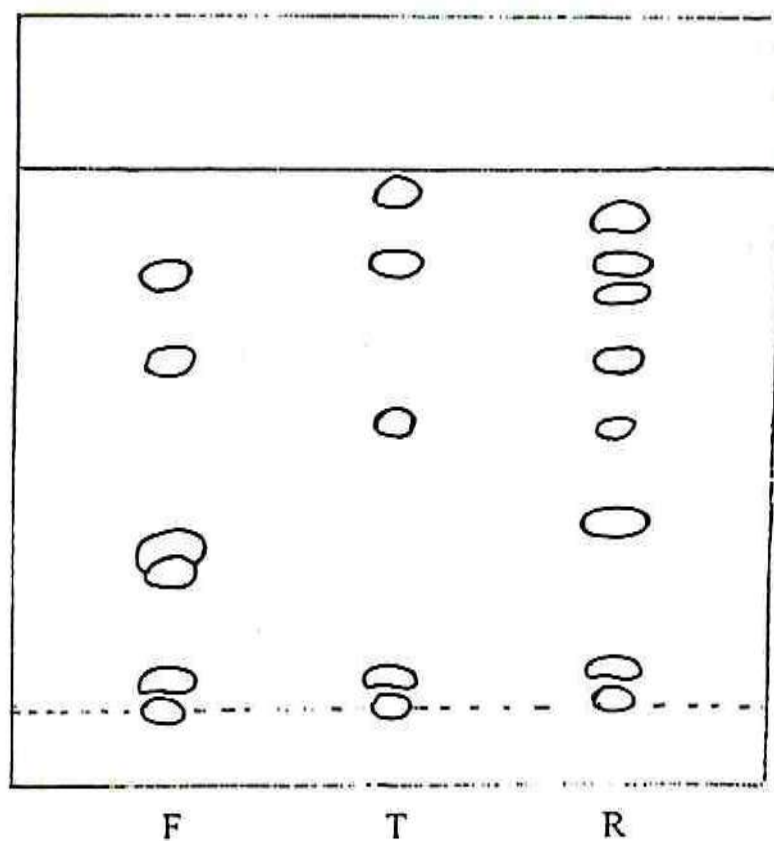


FIG II-3 : Résultats de CCM d'extrait des anthocyanes
 Phase stationnaire : gel de silice
 Phase mobile : EtOAc / MeOH / H₂O (10/1.5/1)

* L'extrait des hétérosides :

TABLEAU II-10 : Rf des composés séparés sur les différents types de phases stationnaires

EtOAc/MeOH/H ₂ O (10/1,5/1)											
Gel de silice				Alumine				Cellulose			
couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine	couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine	couleur	Rf feuille	Rf tige	Rf racine
R-orange	0,97	0,97	-	Marron	1,00	0,99	1,00	Marron	0,96	0,94	0,96
Jaune	-	-	0,96	Orange	0,99	0,98	-	Bleu	0,24	-	0,19
Jaune	0,88	0,85	0,88					J-foncé	0,00	0,00	0,00
J-vert	-	-	0,82								
Mauve	0,77	0,77	0,76								
J-clair	0,73	0,74	-								
J-foncé	0,68	0,69	0,69								
Jaune	0,62	0,63	0,59								
B-clair	0,54	-	0,49								
Jaune	0,45	-	0,42								
B-foncé	0,30	0,29	0,31								
Jaune	0,17	-	0,16								
Mauve	0,13	0,19	-								
Jaune	-	0,08	-								
Bleu	0,05	-	0,045								
Jaune	0,00	0,00	0,00								

J : jaune

B : bleu

R : rouge

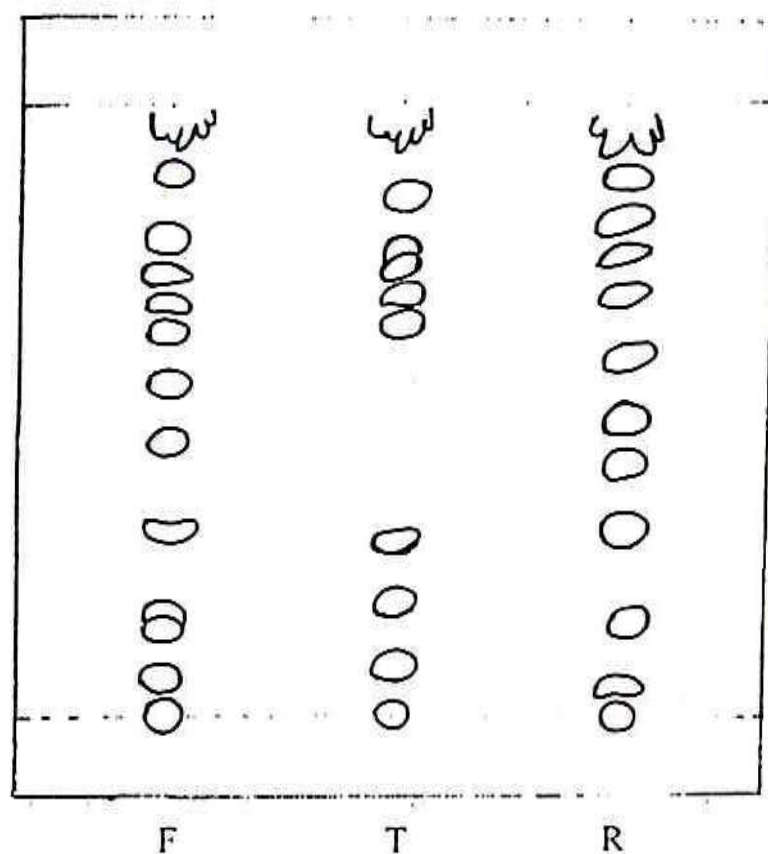


FIG II-4 : Résultats de CCM d'extrait des hétérosides
 Phase stationnaire : gel de silice
 Phase mobile : EtOAc / MeOH / H₂O (10/1.5/1)

3-1-3/ Interprétation :

D'après les tableaux II-7, 8, 9 on remarque que la meilleure séparation des aglycones a été réalisée sur gel de silice avec le dichloro éthane /éthanol (95/5) comme phase mobile. Elle nous a permis de mettre en évidence la présence de 09 composés flavoniques.

On note que tous les organes de la plante contiennent la même composition chimique, mais on ne peut pas dire qu'il sont tous des composés flavoniques.

Pour les anthocyanes les conditions les plus adéquates pour la séparation sont les plaques de gel de silice et éluant : Acétate d'éthyle ; Méthanol ; Eau (10/1,5/1), on constate que les racines sont la partie la plus riche en anthocyanes, elle contiennent 08 produits avec des couleurs et des Rf différents.

L'extrait des hétérosides dans les meilleures conditions de séparation éluant : Acétate d'éthyle ; Méthanol ; Eau (10/1,5/1) et phase stationnaire gel de silice contient 16 composés avec des fluorescences et des Rf différents, dont 14 appartiennent à la partie feuille considérée comme étant la plus riche en hétérosides.

De plus on peut dire que les spots qui apparaissent en couleur jaune sont considérés comme des flavonols, les spots en jaune clair sont des flavones, en bleu sont des méthoxy flavonols et les spots en mauve sont considérés comme des iso flavones.

3-2/ La séparation sur colonne :

La détermination des conditions de séparation par CP et CCM nous aide à procéder à une séparation à grande échelle sur une colonne de diamètre égale à 2 cm et 45 cm de longueur avec les mêmes conditions mais elle nécessite une grande quantité d'extrait brut, ainsi qu'une quantité suffisante de phase stationnaire (gel de silice, cellulose, alumine, polyamides etc.) et une quantité importante de solvant d'élution (la phase mobile), elle est utilisée pour des simples applications [23][24] [44].

3-3/ Chromatographie liquide à haute performance :

Compte tenu de la haute résolution de cette technique de séparation, nous pouvons aujourd'hui identifier plusieurs produits inconnus par une simple comparaison des temps de rétention avec celle des témoins, où la séparation est effectuée par la distribution dynamique de chaque produit entre deux phases (développé par WAGNER et col en 1985) [23][24] [44] comme on peut analyser un nombre important de produits non volatiles tels que les flavonoides[21][16] :

- * la phase stationnaire φ_s
- * la phase mobile φ_m

Là où le temps de rétention est égale au temps écoulé entre le moment de l'injection et celui de l'apparition du sommet de pic d'élution pour un des produits injectés dans l'appareil.

Le produit à analyser est déposé au sommet de la colonne pour que la phase mobile puisse faire migrer les différents composés de notre produit et cela selon leur affinités avec les deux phases (φ_s , φ_m),

Le tableau II-12 rassemble les valeurs des temps de rétention (t_r) de dix étalons séparés sur l'HPLC selon les conditions suivantes [45] :

- 1/ Phase mobile : Méthanol /eau /acide acétique (50:50:5 v/v/v).
- 2/ Mode d'élution : régime isocratique.
- 3/ Débit : 1ml/min
- 4/ Injection : 20 μ l.
- 5/ Longueur d'onde de détection : 254 nm.

TABLEAU II-11 : Temps de rétention de quelques étalons dans les conditions précédentes

<i>Etalon</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>
E₁ : Luteolin-3',7'-diglycoside.	2,269
E₂ : Hesperetin.	7,412
E₃ : Isorhamnetin.	11,405
E₄ : Butein.	1,795
E₅ : Apigenin-7-glycoside.	1,882
E₆ : Luteolin-7-glycoside.	2,839
E₇ : Rhamnetin.	1,822
E₈ : Fisetin.	4,359
E₉ : Hesperidin.	2,851
E₁₀ : Luteolin.	7,556

3-3-1/ Matériels et Appareillages :

1/ constitution du dispositif:

- o chromatographe modèle CBM -10A SHIMADZU communication Bus Modèle.
- o Détecteur type SPD-10A U.V-VIS détecteur SHIMADZU.
- o Pompe type LC-10 AD liquide chromatographe SHIMADZU.

2/ Dans les deux conditions de séparation en mode isocratique on a analysé les extraits suivants :

- a1 / Extrait éthanolique des aglycones
- a2 / Extrait méthanolique des anthocyanes
- a3 / Extrait méthanolique des hétérosides

* La phase stationnaire est la même dans les deux conditions :
Colonne : C18 (4.6 * 150mm ;3,5µm)

* les 1^{er} conditions d'analyses :

- a/ Phase mobile : Acétonitrile / eau (1% d'acide acétique) (32/68 ; v/v/v).
- b/ Mode d'élution : régime isocratique.
- c/ Débit : 1ml/min
- d/ Injection : 20 µl.
- e/ Longueur d'onde de détection : 254 nm.

* les 2^{eme} conditions d'analyses :

- a/ Phase mobile : Méthanol /eau /acide acétique (50:50:5 ; v/v/v).
- b/ Mode d'élution : régime isocratique.
- c/ Débit : 1ml/min
- d/ Injection : 20 µl.
- e/ Longueur d'onde de détection : 254 nm.

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les 2^{eme} conditions d'analyses sont les meilleurs « voir l'annexes »

3-3-2/ Résultats et Discussions :

Les résultats de séparation sur HPLC pour les trois parties de la plante selon les 2^{ème} conditions d'analyses :

A/ Extrait des aglycones :

TABLEAU II-12 : Temps de rétention et les concentrations des fractions aglyconiques

<i>Organes</i> <i>Comps</i>	<i>Feuilles</i>			<i>Tiges</i>			<i>Racines</i>		
	<i>Tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)	<i>tr</i> (Et)	<i>tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)	<i>tr</i> (Et)	<i>tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)	<i>tr</i> (Et)
1	2.545	1.9405	E ₈	2.710	1.7978	E ₈	0.128	0.0126	E ₈
2	3.327	5.0592		3.003	1.1547		2.550	1.3307	
3	3.583	2.4269		3.256	2.4599		3.273	5.4039	
4	3.820	7.5163		3.358	1.1435		3.474	1.7904	
5	4.231	22.2163		3.433	2.3649		3.701	3.3895	
6	4.856	7.3987		4.004	14.7704		4.107	11.6775	
7	5.269	14.8868	E ₂	4.358	4.4516	E ₁₀	4.351	7.1008	E ₂
8	6.809	10.6817		4.717	4.3371		4.745	4.2296	
9	7.463	3.7864		4.891	11.4690		5.128	7.2190	
10	8.398	2.9851		6.365	6.4726		5.419	5.4129	
11	9.567	0.0883		6.658	5.8299		6.117	0.6175	
12	10.623	6.8703		7.728	13.6525		6.455	6.5268	
13	14.942	0.2780		10.401	10.0423		7.343	3.7576	
14	16.808	0.0274		17.703	14.3756		8.233	4.4997	
15	17.964	11.5655		18.858	5.6782		8.767	1.8497	
16	19.133	2.2725		-	-		9.676	1.2880	
17	-	-		-	-		10.450	6.7585	
18	-	-		-	-		13.332	0.3435	
19	-	-		-	-		17.826	9.2614	
20	-	-		-	-		19.035	14.7726	
21	-	-		-	-		24.476	2.7578	

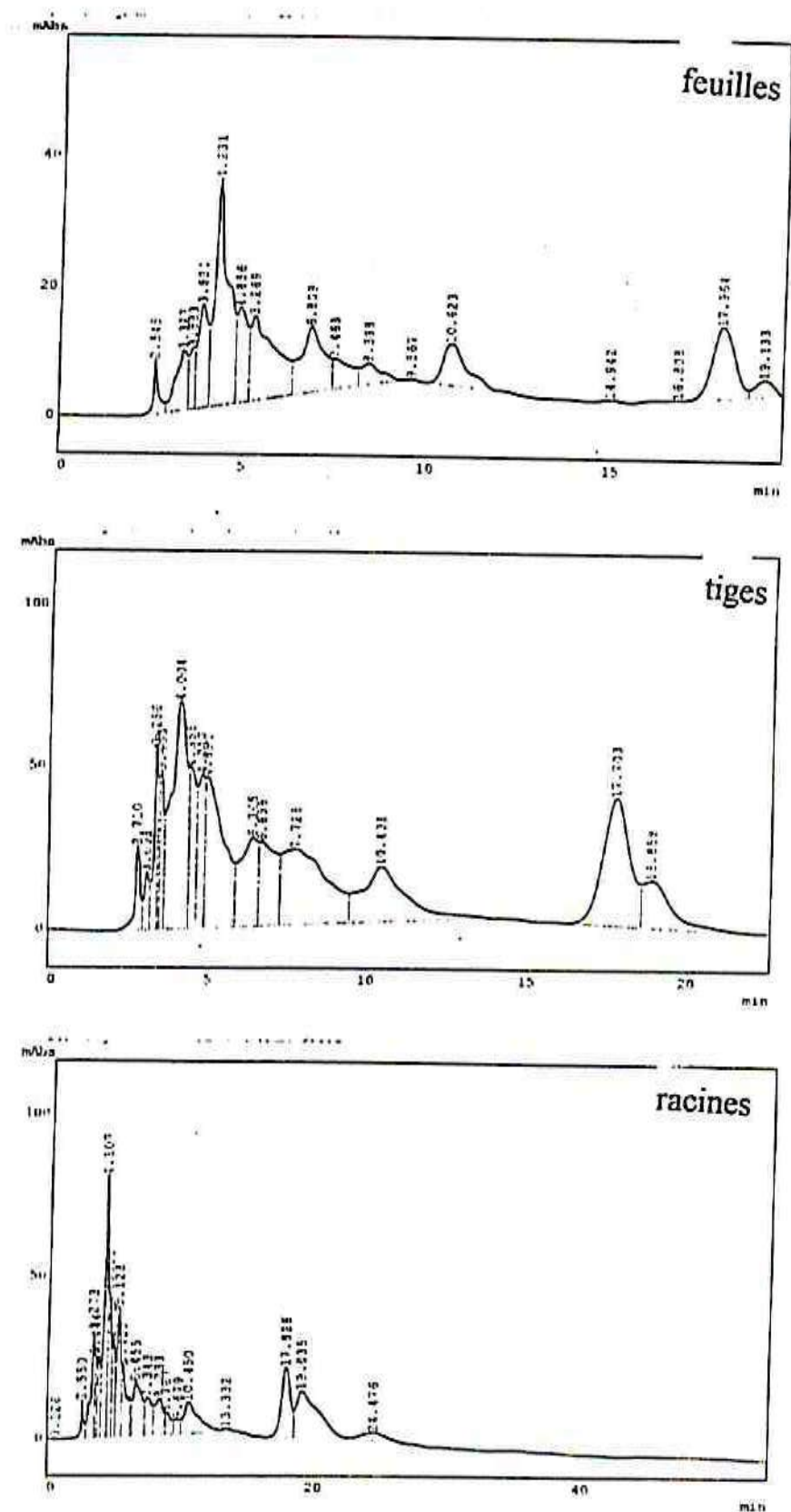


FIG II-5 : Chromatogramme HPLC des aglycones en mode isocratique $\lambda = 254$ nm
Phase mobile : MeOH / H₂O / CH₃COOH (50:50:5)
Phase stationnaire : colonne : C18 (4.6* 150 mm ; 3.5 m)

B/ Extrait des anthocyanes :

TABLEAU II-13: Temps de rétention et les concentrations des fractions anthocyaniques (voir l'annexes)

Organes Comps	Feuilles		Tiges		Racines	
	<i>tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)	<i>tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)	<i>tr</i> (min)	<i>Conc</i> (%)
1	3.354	2.3980	3.564	8.1669	1.514	0.5220
2	3.997	5.0230	3.919	2.4377	2.584	1.7074
3	4.402	4.5646	4.292	5.7765	3.143	3.6183
4	4.734	5.5151	4.644	5.2650	3.375	5.3070
5	5.177	8.3713	5.157	10.5259	3.504	3.6785
6	5.642	7.3458	5.863	12.1574	3.815	5.0195
7	5.883	4.8273	6.571	9.9714	4.178	17.0602
8	6.252	3.6746	7.100	5.5409	4.782	4.2543
9	6.624	5.4854	7.542	3.8975	5.219	8.2140
10	7.129	5.1924	8.412	13.7585	5.455	9.7619
11	7.613	2.7062	9.102	6.6594	6.614	4.2303
12	8.436	12.1213	9.784	4.3061	6.937	4.0317
13	9.171	7.5686	10.445	8.0150	7.472	6.8776
14	10.477	4.2822	12.918	2.9509	8.454	2.7895
15	11.214	2.9161	15.759	0.5707	9.082	3.7921
16	12.088	2.2218	-	-	9.294	1.9874
17	12.934	1.2233	-	-	9.668	4.2242
18	13.433	1.0161	-	-	10.215	4.0557
19	14.003	2.5146	-	-	11.879	2.5873
20	15.856	2.2840	-	-	12.538	2.9134
21	18.074	0.0221	-	-	14.142	0.4061
22	21.841	4.8127	-	-	14.860	1.3618

C/ Extrait des hétérosides :

TABLEAU II-14: Temps de rétention et les concentrations des fractions hétérosidiques (voir l'annexes)

<i>Organes</i> <i>Comps</i>	<i>Feuilles</i>			<i>Tiges</i>			<i>Racines</i>		
	<i>Tr</i> <i>(min)</i>	<i>Conc</i> <i>(%)</i>	<i>tr</i> <i>(Et)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>Conc</i> <i>(%)</i>	<i>tr</i> <i>(Et)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>Conc</i> <i>(%)</i>	<i>tr</i> <i>(Et)</i>
1	2.444	1.3041	E ₆	2.426	0.7230	E ₆	1.023	0.0325	E ₉
2	3.390	8.1158		3.188	6.1458		2.811	2.2889	
3	3.684	8.0709		3.402	5.6326		3.358	18.4206	
4	3.903	4.5266		3.553	4.1310		3.815	5.2656	
5	4.169	26.7790		3.748	6.3295		4.164	23.0022	
6	5.234	5.8178		4.211	20.4617		5.179	16.5843	
7	5.535	12.9470		5.013	2.3757		6.670	6.9457	
8	6.660	5.9226		5.259	5.2779		7.490	7.0432	
9	7.600	6.2326		5.557	10.1578		9.644	14.8661	
10	8.325	3.2924		6.929	8.6286		11.831	2.6265	
11	8.880	11.0118		7.538	9.2481		12.515	2.1774	
12	12.392	2.0368		8.903	2.4740		14.076	0.4626	
13	13.975	0.5075		9.421	4.4068		15.053	0.2845	
14	16.436	0.2191	E ₃	9.942	4.2277	E ₃	-	-	
15	18.244	0.8644		11.756	2.1464		-	-	
16	19.855	0.4660		12.267	2.7065		-	-	
17	23.670	0.1444		14.244	1.2883		-	-	
18	25.211	0.1544		15.142	0.9988		-	-	
19	30.705	0.6825		15.900	0.8763		-	-	
20	40.461	0.9044		18.009	1.3005		-	-	
21	-	-		19.153	0.4629		-	-	

tr : le temps de rétention.

Conc : concentration.

Et : étalon.

3-3-3/ Interprétation :

* Le nombre des fractions équivalentes entre les parties de la plante sont dénombrés comme suit :

	<i>Les aglycones</i>	<i>Les anthocyanes</i>	<i>Les hétérosides</i>
* Entre les feuilles et les tiges	07	12	09 ^a
* Entre les feuilles et les racines	09	10	06
* Entre les tiges et les racines	07	10	08
* Entre feuilles, tiges et les racines	05	08	05

On a remarqué d'après les temps de rétention des composés équivalents qu'il y a une petite différence dans les valeurs des composés identifiés, en effet d'après une étude effectuée sur les étalons indiquent qu'il y a une interaction entre les différents composés de l'extrait par exemple le premier produit t_r (feuilles) = 2.545 min, t_r (tiges) = 2.710 min et t_r (racines) = 2.550 min

* d'après le tableau II-13 (les aglycones) on remarque que la partie la plus riche en aglycones sont les racines.

En comparant les temps de rétention des produits du tableau II-13 avec ceux des étalons on remarque qu'il y a la possibilité de l'existence du produit E_8 dans les trois parties de la plante et du produit E_2 dans les feuilles et les racines et l'existence du produit E_{10} seulement dans les tiges.

* Le tableau II-14 (les anthocyanes) nous montre que le nombre des produits dans les feuilles et les racines est quasiment le même, et par manque d'étalons pour les anthocyanes on n'a pas pu identifier la composition chimique de l'extrait des anthocyanes.

* Pour les hétérosides on remarque que la partie la plus riche sont les tiges, elles contiennent 21 composés avec des temps de rétention différents.

* On constate d'après les tableaux II-12 et II-15 qu'on peut avoir le E_6 dans l'extrait les hétérosides des feuilles et les tiges, le E_3 dans les tiges et le E_9 dans les racines.

D'après les résultats on peut dire qu'au sein de la même plante on ne peut pas avoir le même nombre de produits flavoniques et les mêmes composés dans toutes les parties de la plante.

3-4/ Chromatographie en phase gazeuse :

C'est une méthode analytique très pratique de très haute performance, elle exige des quantités de l'ordre du milligramme ou de micro gramme, elle permet de séparer des mélanges très complexes.

Dans cette technique la phase mobile est constituée d'un gaz appelé le « gaz vecteur » exemple (N_2 , He_2 , H_2), ce gaz traverse une colonne renfermant de la phase stationnaire, la température de l'injecteur doit être toujours supérieure au point d'ébullition du constituant le moins volatil de 20 à 30 °C.

Maciej Stobiecki est arrivé à identifier la structure des flavonoides glycosiles séparés sur une colonne chromatographique par GC/MS dans les conditions suivantes :[27]

- * Chromatographie Gaz Hewlett-Packard modèle 5980.
- * Détecteur FID
- * La température initiale : 100°C
- * La température finale : 3000°C
- * La vitesse : 10°C/min
- * Colonne capillaire de silice fondue (30m*0.2mm) avec DB 1705,
- * Le composé élué est ionisé par ionisation chimique ou par ionisation électrique, pour l'ionisation chimique on utilise l'ammoniaque dans la source à 125°C mais dans le cas de l'ionisation électrique le voltage égale à 70 eV et la température de la source égale 200°C.

3-4-1/ Matériels et Appareillages :

1/ Appareillage :

- * Chromatographie Gaz modèle VARIAN STAR # 1 CP 3800.
- * Détecteur FID type 3800 (10 volts).

2/ les conditions d'analyse :

- * colonne capillaire : de silice fondue.
- * phase stationnaire : CP-sil 5 CB
- * longueur de colonne : 60 m.
- * diamètre intérieur : 0.25 mm.
- * diamètre extérieur : 0.39 mm.

<i>Température (C°)</i>	<i>Vitesse (C°/min)</i>	<i>Durée (min)</i>	<i>Totale (min)</i>
Initiale =170		10,00	10.00
Finale =250	5,00	10,00	36.00

3-4-2/ Résultats et Discussions :

L'analyse effectuée par CPG nous a permis d'obtenir les résultats et les profils suivants :

TABLEAU II-15: Temps de rétention des fractions des extraits (aglycone et anthocyane).

<i>Extrait</i> <i>Composition</i>	<i>Aglycones</i>			<i>Anthocyanes</i>		
	<i>tr</i> <i>(min)</i>			<i>tr</i> <i>(min)</i>		
	<i>feuilles</i>	<i>tiges</i>	<i>racines</i>	<i>feuilles</i>	<i>tiges</i>	<i>Racines</i>
1	5,73	5,73	5,76	5,70	5,64	5,71
2	6,05	6,05	6,06	6,10	6,11	6,10
3	7,91	7,92	6,40	6,41	6,83	6,40
4	8,07	8,97	8,10	8,99	9,09	8,98
5	8,97	14,16	8,98	10,68	11,33	18,48
6	16,33	20,75	11,14	13,54	18,41	20,05
7	18,95	21,53	13,82	18,49	18,59	23,29
8	19,60	24,85	19,58	20,06	19,70	25,72
9	20,03	-	20,43	20,68	20,38	-
10	20,42	-	24,27	22,02	22,16	-
11	25,78	-	24,90	22,44	23,07	-
12	-	-	27,04	24,13	23,20	-
13	-	-	-	28,14	24,18	-
14	-	-	-	28,59	24,72	-
15	-	-	-	-	27,23	-
16	-	-	-	-	27,41	-
17	-	-	-	-	28,14	-
18	-	-	-	-	29,24	-

3-4-3/ Interprétation :

La CPG nous montre qu'il existe 04 produits équivalents dans l'extrait des aglycons entre les feuilles et les tiges, 06 composés équivalents entre les feuilles et les racines et 04 composés entre les tiges et racines.

07 produits équivalents dans l'extrait des anthocyanes entre les feuilles et les tiges, d'autant plus qu'il existe 06 composés équivalents entre les feuilles et les racines, plus 05 composés entre les tiges et racines.

Mais pas forcément sont des composés flavoniques.

On remarque deux pics intenses dans les profils des extraits qui sont dus aux solvants initiaux (voir l'annexes)

- Dans le cas de l'éthanol (l'extrait des aglycones) $t_r = 6.05$ min.
- Dans le cas de méthanol (l'extrait des anthocyanes et les hétérosides) $t_r = 5.69$ min.

FIG II-8 : Profil CPG des aglycones
Phase mobile : gaz Hélium
Phase stationnaire : CP-Sil 5 CB

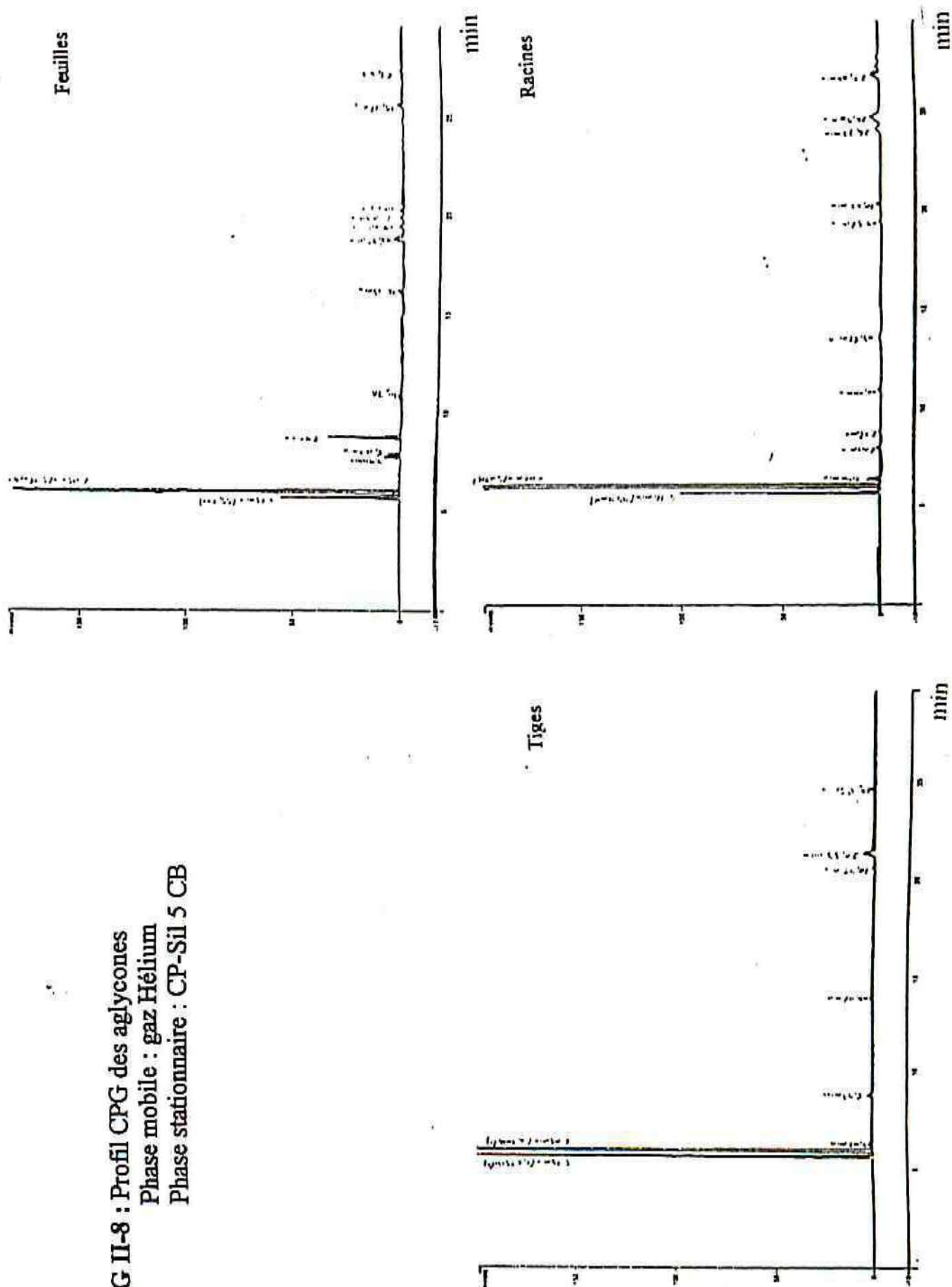
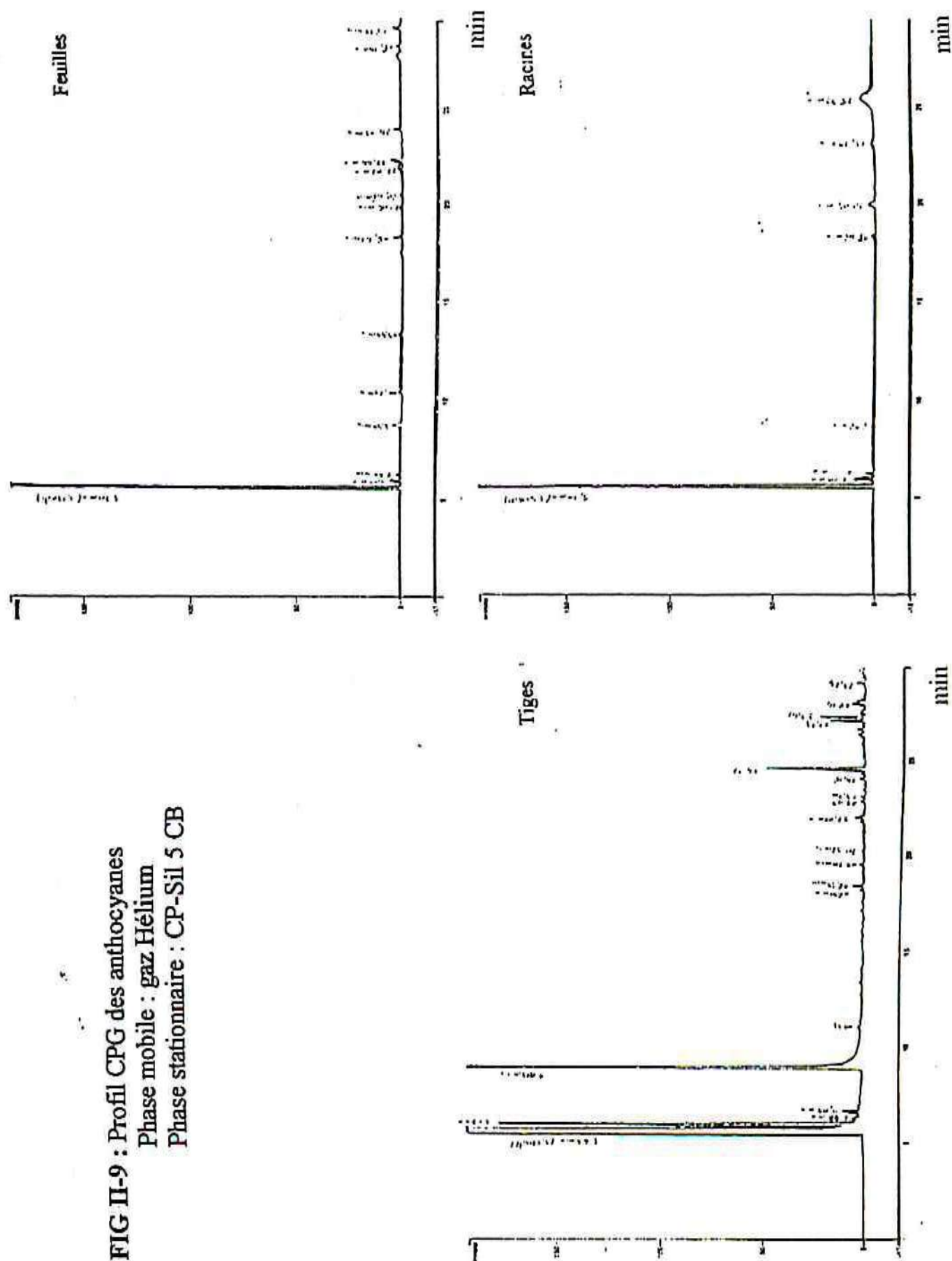


FIG II-9 : Profil CPG des anthocyanes
Phase mobile : gaz Hélium
Phase stationnaire : CP-Sil 5 CB



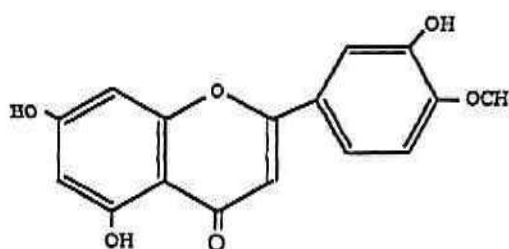
3-5/ Conclusion :

La CCM mono-dimensionnelle et l'HPLC des extrait nous amène à identifier des produits avec des fluorescence, des R_f et des t_r différents, de plus on constate que la CCM ne nous donne pas la composition réelle en principe actif dans les parties de la plante.

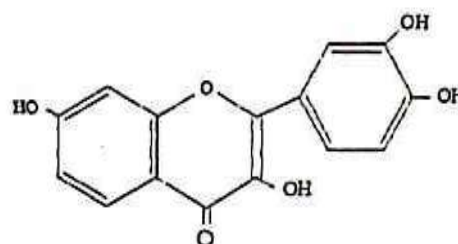
En comparant les deux techniques de séparation l'HPLC et la CPG on remarque que la première nous donne plus de renseignements sur la composition chimique des extraits et cela est due à la température maximale du dispositif (CPG) égale à 250 C°, et cette température n'est pas suffisante pour faire passer tous les produits à l'état volatile. D'après la bibliographie la température d'ébullition pour les composés flavoniques est entre 200 C° et 400 C°.

L'HPLC nous a permis d'identifier l'existence de quelques produits, en effet l'extrait des aglycones contient les produits E₂, E₈ et E₁₀, l'extrait des hétérosides contaient le E₆ et E₉ et l'extrait des anthocyanes on n'a pas pu identifier ces produits et cela est due à l'absence des étalons pour cette classe flavonique

E₂ : Hesperetin



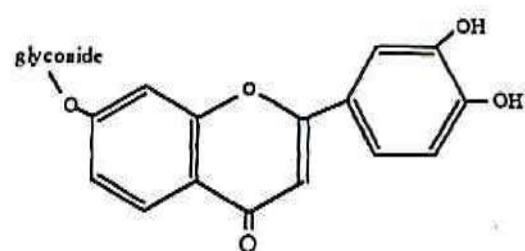
E₈ : Fisetin



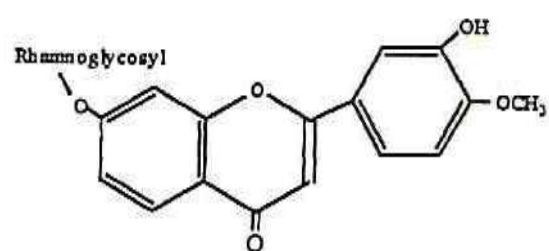
E₁₀ : Luteolin



E₆ : Luteolin-7-glycoside

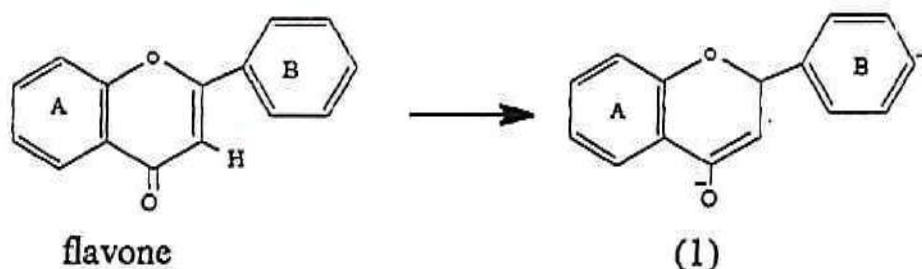


E₉ : Hesperidin

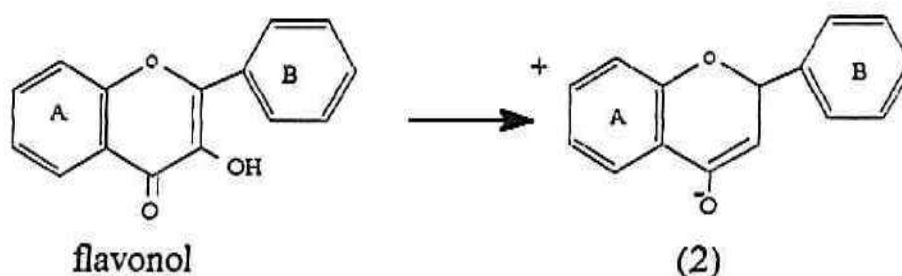


CHAPITRE III :
Identification structurale
des composés flavoniques

I/ D'après la bibliographie le spectre d'absorption ultraviolet des flavones et les flavonols dans le méthanol présente généralement deux bandes d'absorption, la bande I situé vers 300 à 400 nm correspondant à la structure (1), et ayant une relation avec le noyau A



la bande II se trouve vers 240 nm à 270 nm, attribuable à la structure (2) suivante :



La bande II présente un seul maximum vers 270 nm dans le cas des flavones et des flavonols substitués en position '4, par contre dans le cas de deux substitutions en '3 et '4 cette bande présente deux maximums (A, B) d'intensité entre 250 et 275 nm.

La substitution des flavones et les flavonols a un effet sur le déplacement des deux bandes (I et II) (le déplacement de la longueur d'onde λ), pour cette raison on utilisera des réactifs pour identifier la substitution structurale des composés flavoniques :

1-1/ le réactif NaOMe :

le méthoxyl de sodium est une base forte et elle peut ioniser les groupes OH dans les flavonoides, actuellement l'effet de ce réageant sur les spectres des flavones et les flavonols est d'identifier les groupes 3 et/ou 4 hydroxyles libres.

En présence de groupe 4 [OH] libre l'ajout de NaOMe à un effet bathochrome de 40 à 65 nm sur la bande d'absorption (I) avec une diminution de l'intensité, d'autre part l'absence de groupe 4 [OH] libre dans les flavonols a aussi un déplacement bathochrome sur la bande I entre 50 et 60 nm qui indique la présence de groupe 3 [OH] libre avec une diminution de l'intensité.

Les flavanones en présence de NaOMe donne un déplacement bathochrome de bande II, on a 35 nm pour les 5,7-dihydroxyflavanones et 60 nm pour les 5-hydroxyflavanones avec une augmentation de l'intensité de bande II, les dihydroflavonols l'effet bathochrome est selon la présence ou l'absence de groupe hydroxyle en position (5), les spectre des composés 5,7-dihydroxydihydroflavonol ont un déplacement de 35 à 40 nm marqué sur la majorités des pics d'absorptions, mais la présence de [OH] sur la position (7) seulement à un déplacement de 55 à 60 nm dans les deux bandes avec une augmentation de l'intensité de bande II. [11][23]

Les flavonols qui contiennent des groupes OH libre en position 3 et 4 sont instables dans le méthoxyl de sodium. [11]

1-2/ Le réactif NaOAc :

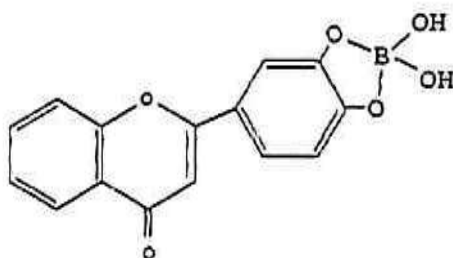
L'acétate de sodium est une base faible, elle peut ioniser spécialement les groupes hydroxyles qui ont un rôle d'acide dans les flavones, flavonols, flavanols et les dihydroflavonols, l'ionisation de [OH] en position (7) à un effet sur la bande II mais l'ionisation des groupes [OH] en position 3 et / ou 4 influe sur la bande I.

NaOAc est particulièrement un bon détecteur des hydroxyles en position (7), en outre, la présence de ce groupe sur cette position dans les flavones et flavonols à un effet bathochrome de 5 à 20 nm, comme on remarque un déplacement de 34 à 37 nm pour les 5,7-dihydroxyflavanones et 5,7-dihydroxydihydroflavonol, mais la présence des oxygènes en position 6 et 8 des flavones, flavanones et les dihydroflavonol donne un effet bathochrome faible ou égale à zéro. Pour les flavones et les flavonols l'existence des groupes oxygénés en position 3 et 4 donnent un déplacement

bathochrome de 20 à 25 nm mais il apparaît sur la bande II (partie B), dans le cas d'un groupement 5 [OH] l'effet bathochrome doit être entre 20 et 35 nm pour la partie B bande II. [11]

1-3/ Le réactif NaOAc / H₃BO₃ :

Le NaOAc / H₃BO₃ en solution méthanolique forme un complexe avec les groupes hydroxylés en position ortho (orthodihydroxyle) existant sur le noyau flavonique comme suit :



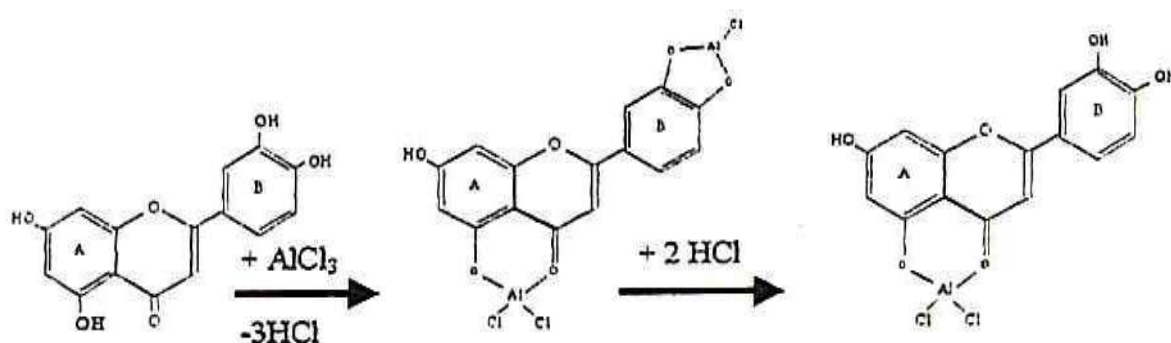
Les flavones et flavonols possèdent des groupes orthodihydroxyyles en position '3 et '4 provoquent un déplacement bathochrome de la bande I entre 12 et 30 nm par la présence de ce réactif, l'existence des groupes dihydroxyyles sur le cycle A en C6, 7 et C7, 8 produit un déplacement bathochrome de 5 – 10 nm dans la bande I et un déplacement de 10 à 15 nm de la même bande pour les iso flavones et les flavanones.

1-4/ Le réactif AlCl₃ et AlCl₃ /HCl :

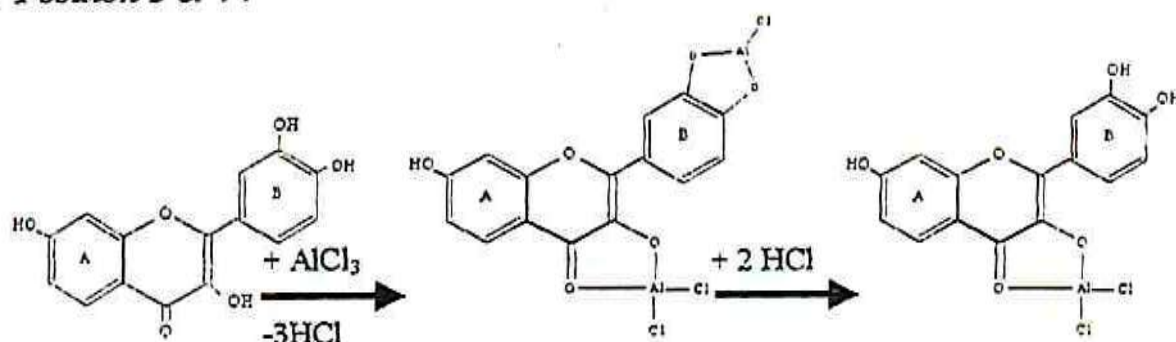
le chlorure d'aluminium forme un complexe stable dans HCl avec les composés ayant un hydroxyle en 3 ou 5 et la fonction carbonyle selon le schéma V, elle provoque un dédoublement des bandes (I, II) suivit par un déplacement bathochrome différent, d'environ 45 nm pour les 5-hydroxyflavones et de 60 nm pour les flavonols, d'autant plus elle forme un complexe avec les systèmes orthodihydroxyle ('3 et '4 dans le cycle B et 6, 7 ou 7, 8 dans le cycle A), mais l'ajout de HCl à un extrait méthanolique avec le chlorure d'aluminium détruit le complexe formé avec les système orthodihydroxyle, ce que nous permet d'identifier la présence des deux hydroxyles en position ortho par une simple comparaison des spectres obtenus d'une part avec le chlorure d'aluminium seul. et D'autre part avec le chlorure d'aluminium acidifié. L'existence de système '3 et '4 dihydroxyyles provoque un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm, mais la présence du

système 6-7 ou 7-8dihydroxyle donne un déplacement hypsochrome de 20 à 25 nm.[11][23][24]

a/ Position 4 et 5 :



b/ Position 3 et 4 :



- L'analyse structurale a été effectuée sur des composés fractionnés sur des plaques de gel de silice pour les trois classes avec des réactifs spécifiques précédents.

2/ Résultats et Discussions :

Les longueurs d'ondes maximales (moyenne pour les trois parties) de chaque classe flavonique sont comme suit (pour les anthocyanes et les hétérosides voir l'annexes) :

<i>Classe flavonique</i>	<i>Longueur d'onde $\lambda_{Max}(nm)$</i>
Aglycones	276.36, 295.51 et 316.78
Anthocyanes	276.07, 293.51, 323.2
Hétérosides	275.75, 294.16, 314.15

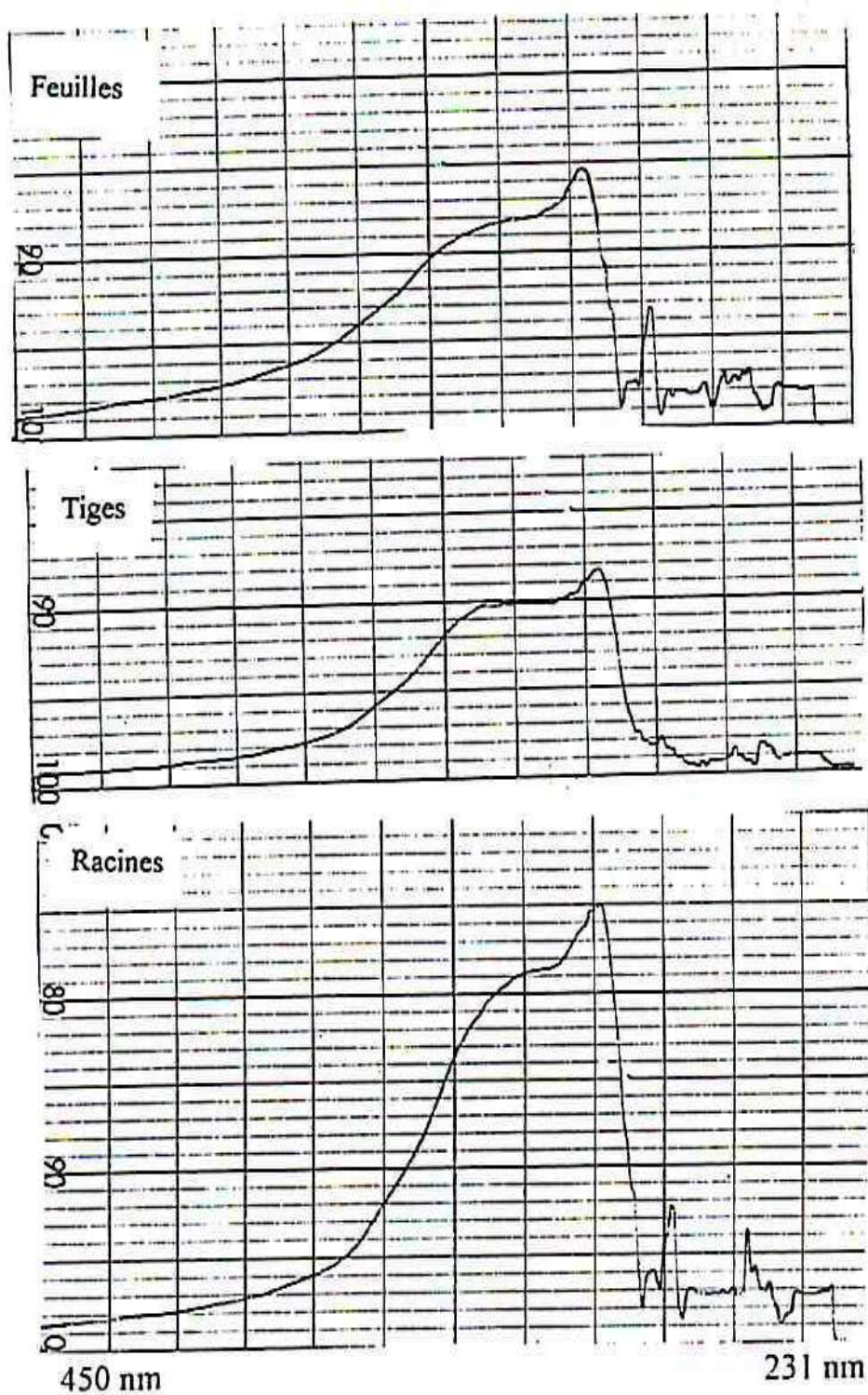


FIG III-1: Spectre UV des aglycones
 $\lambda = 231 \text{ à } 450 \text{ nm}$

Les résultats de l'étude structurale des différentes classes flavonoïques :

1/ Pour l'extrait des aglycones :

1-1/ les données du composé n°1 sont :

- La fluorescence mauve sous lumière UV
- $R_f = 0.95$
- MeOH : 272.9 / 291.9 / 297.6 ép / 303.4 ép

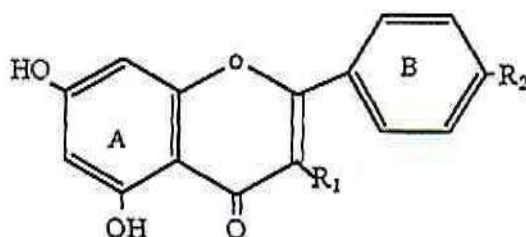
l'ajout des réactifs nous donne les λ suivantes :

- NaOMe : 294.8 / 298.6 ép. / 304.3 ép.
- $AlCl_3$: 288.13 / 297.7 ép. / 303.4 ép. / 324.3
- $AlCl_3 / HCl$: 276.7 / 282.4 / 290 / 298 ép / 303.4 ép / 324.3
- NaOAc : 274.8 / 282.4 / 280.5 ép. / 288 / 294.8 ép. / 303.4 ép.
- NaOAc / H_3BO_3 : 280.5 / 303.36 / 326.2 ép

1-2/ Interprétation :

- fluorescence mauve sous lumière UV est due à un OH substitué ou H en position 3.
- MeOH : $\{\lambda_{II} = 272.9 \text{ nm}\}$ donc il y a la possibilité d'avoir un flavone substitué en position 4'
- Na OMe : $\Delta \lambda(I) \{ \text{MeOH et NaOMe} \} = 294.8 - 291.9 = 3 \text{ nm} < 40 \text{ nm}$ du a l'absence d'un OH en position 3 ou 4'
- $AlCl_3$: $\Delta \lambda(I) \{ (\text{MeOH et } AlCl_3) \} = 3024.3 - 291.9 = 32.4 \text{ nm}$ du a l'existence de OH en 5 pour les flavones
- $AlCl_3 / HCl$: $\Delta \lambda(I) \{ AlCl_3 \text{ et } AlCl_3/HCl \} < 20$ l'absence de système '3 et '4 dihydroxyles
- NaOAc : $\Delta \lambda (II) \{ \text{MeOH et NaOAc} \} = 282.4 - 272.9 = 8 \text{ nm}$ indique l'existence d'un OH en 7

D'après ces données on peut proposer la structure suivante :



R_1 : H, OMe
 R_2 : OMe

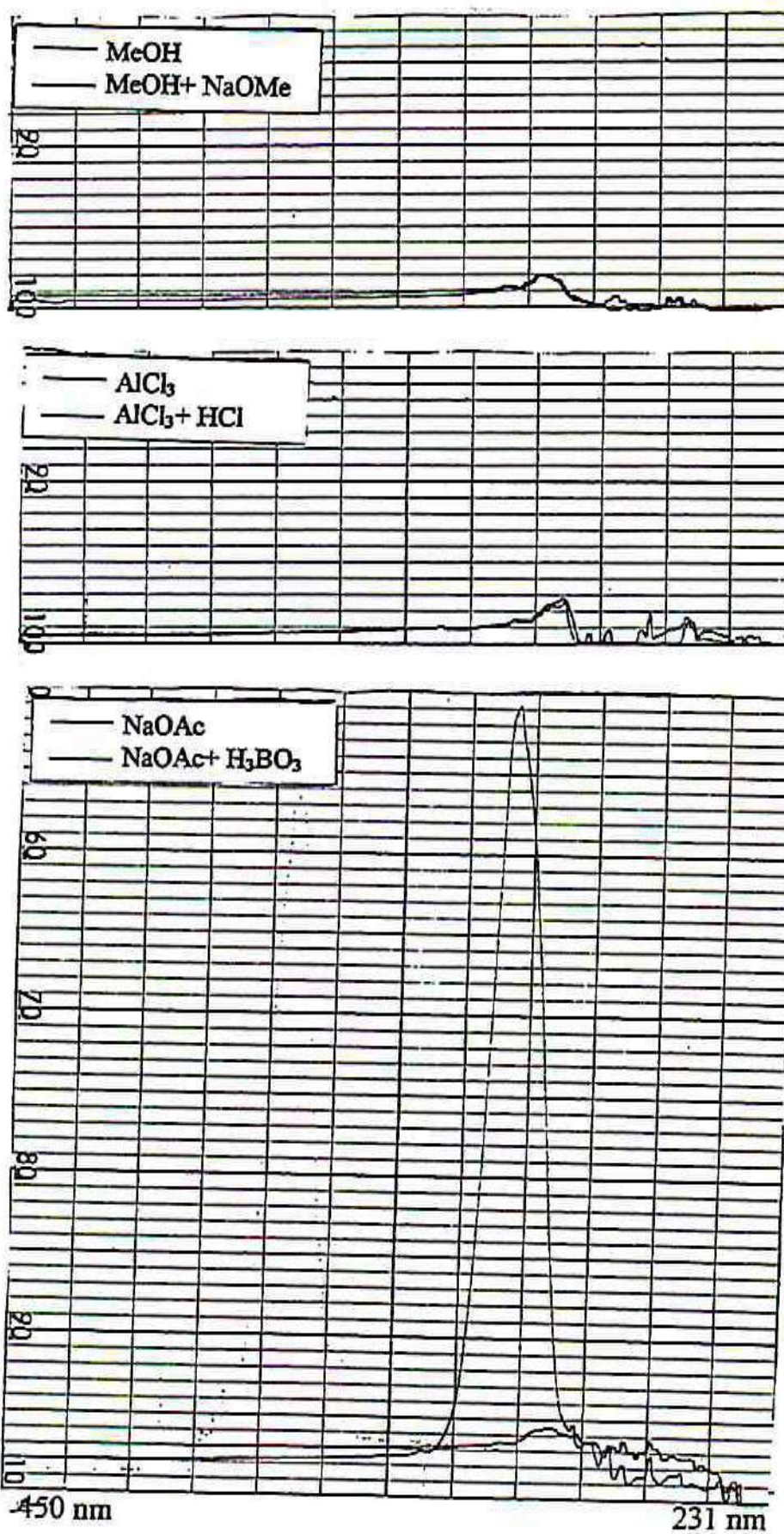


FIG III-4 : Spectre UV de composé n°=1 des aglycones
 $\lambda = 231$ à 450 nm

2/ Pour l'extrait des hétérosides :

2-1 les données du composé n°2 sont:

- La fluorescence jaune vert sous lumière UV
- $R_f = 0.06$
- MeOH : 280.49 / 284.3 ép / 291.9 / 305.3 ép / 326.2

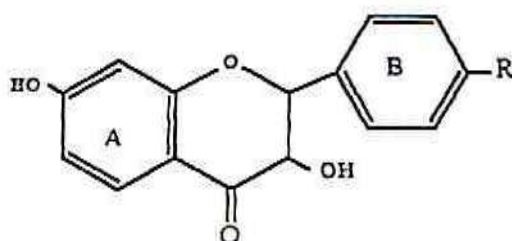
l'ajout des réactifs nous donne les λ suivantes :

- NaOMe : 286.2 ép. / 291.9 / 297.69 ép. / 303.4 ép. / 326.22
- $AlCl_3$: 279.6 / 286.2 / 293.8 / 297.7 ép. / 303.4 ép. / 326.2
- $AlCl_3 / HCl$: 282.4 / 287.2 ép. / 291.9 / 303.4 ép. / 326.2
- NaOAc : 286.2 / 297.7 ép. / 303.4 ép. / 324.3
- NaOAc / H_3BO_3 : 280.5 / 282.4 ép. / 301.5 / 326.2

2-2/ Interprétation :

- fluorescence jaune vert sous lumière UV est due à un OH en position 3
l'absence d'un OH en position 5
- MeOH : $\{\lambda_{II} = 280.49 \text{ nm}\}$ donc il y a la possibilité d'avoir un flavone substitué en position 4'
- $AlCl_3$: $\Delta \lambda(I) \{ (MeOH \text{ et } AlCl_3) = 326.2 - 326.2 = 0 \text{ nm}$ du a l'absence d'un OH en 5 pour les flavone.
- $AlCl_3 / HCl$: $\Delta \lambda(I) \{ AlCl_3 \text{ et } AlCl_3/HCl \} = 326.2 - 326.2 = 0$ l'absence de système '3 et '4 dihydroxyles
- NaOAc : $\Delta \lambda (II) \{ MeOH \text{ et } NaOAc \} = 286.2 - 280.49 = 5.7 \text{ nm}$ indique l'existence d'un OH en 7

D'après ces données on peut proposer la structure suivante :



$R = \text{Me ou OMe}$

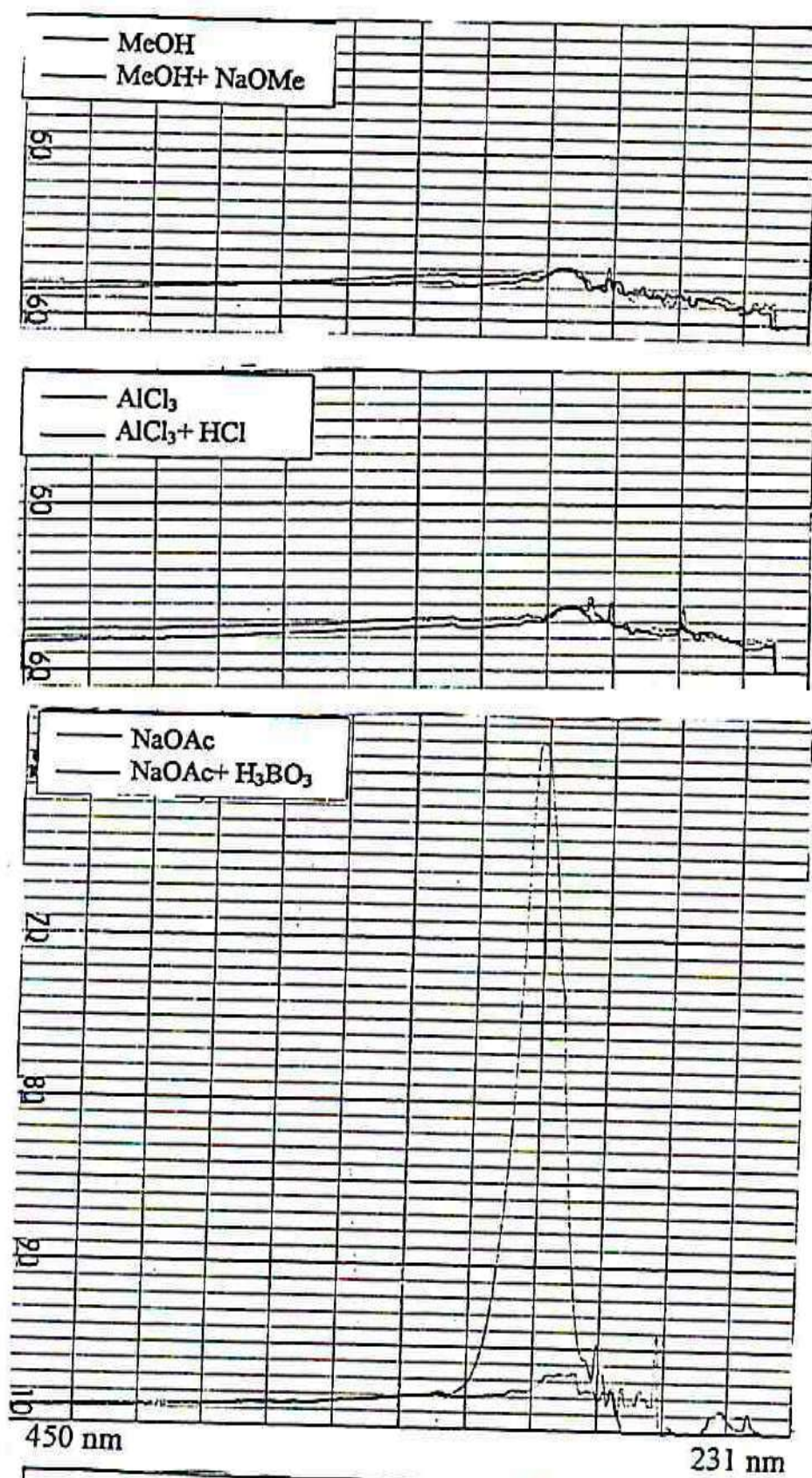


FIG III-5 : Spectre UV de composé n°=2 des hétérosides
 $\lambda = 231 \text{ à } 450 \text{ nm}$

D'après cette structure il faut dire qu'il y a la possibilité d'avoir un groupement osidique en position 6 ou 8 de type « C-glycoside ».

Impossible d'obtenir une substitution de type O-glycoside tant que les deux positions 3 et 7 sont occupée .

CHAPITRE IV :
Influence du climat
aride sur la teneur des
plantes en flavonoides

1/ Les conditions climatiques de la région de Ouargla :

le climat de Ouargla est caractérisé par les paramètres suivant :

1-1/ Température :

La moyenne annuelle de température est de 20,7C° avec 10,4 C° pour le mois le plus froid (janvier) et 31,9 pour le mois le plus chaud (juillet), pour la période 1990-2000.

1-2/ Précipitation :

Elle est irrégulière et rare, la précipitation dans l'année est environ de 3,62 mm.

1-3/ Humidité :

A cause de la température élevée et la faible précipitation dans la région de Ouargla on remarque que l'humidité relative de l'air est très faible, elle est de l'ordre de 25,36 % en mois de juillet et de 64,91% en mois de janvier, d'où la moyenne annuelle est de 44,3 %.

1-4/ Evaporation :

On remarque que la moyenne d'évaporation est très élevée, surtout lorsqu'elle se trouve renforcée par des vents chauds. Elle est de l'ordre de 215,67 mm par an. l'évaporation atteint son maximum (338,45 mm) au mois de juillet et son minimum (104,3 mm) au mois de janvier.

1-5/ Insolation :

La région de Ouargla est caractérisée par sa forte insolation avec un minimum de 158,82 heures au mois de décembre et un maximum de 314,82 heures au mois de juillet.

1-6/ Vent :

Dubief en 1963 a constaté dans la région de Ouargla que les vents les plus forts soufflent du nord-est / sud-ouest.

Les vents les plus dominante :

- En hiver sont ceux d'ouest.
- En printemps sont les vents de nord et l'ouest.
- En été sont les vents de nord-est.
- En automne sont ceux de nord-est et de sud-ouest.

* Le tableau IV-1 suivant nous présenté les données climatique de la région de Ouargla pour la période 1990 - 2000.

TABLEAU IV-1 : Données climatiques de la région de Ouargla

<i>Paramètres Mois</i>	<i>Température (C°)</i>	<i>Précipitation (mm)</i>	<i>Humidité (%)</i>	<i>Insolation (Heure/mois)</i>	<i>Vitesse de vent (m/s)</i>
<i>Janvier</i>	10,39	8,69	64,91	163,00	2,82
<i>Février</i>	12,30	1,54	56,73	189,64	3,06
<i>Mars</i>	15,46	6,23	47,27	221,73	4,03
<i>Avril</i>	19,08	4,12	39,55	226,18	4,70
<i>Mai</i>	24,09	2,82	32,73	270,73	4,77
<i>Juin</i>	28,55	0,32	28,00	311,36	5,05
<i>Juillet</i>	31,86	0,14	25,36	314,82	4,55
<i>Août</i>	31,46	0,03	28,82	290,45	3,97
<i>Septembre</i>	27,66	4,06	35,91	194,64	4,19
<i>Octobre</i>	21,46	6,00	48,73	201,91	3,68
<i>Novembre</i>	15,16	4,98	58,64	172,27	2,81
<i>Décembre</i>	10,93	4,45	62,00	158,82	2,74
<i>La moyenne Annelle</i>	20,7	<i>Som = 43,38</i>	44,05	226,29	3,86

Source : O.N.M. Ouargla

2 / L'effet du climat sur la production des principes actifs

La formation des principes actifs peut être influencé par les conditions climatiques.

* La production de ces derniers par le végétal dépend de deux facteurs :

a/ Facteurs internes :

Toutes les plantes ont des caractéristiques héréditaires. D'autre part la fabrication d'un principe actif est spécifique a certaines espèces dans des conditions climatiques bien précises. [2]

b/ Facteurs externes :

Deux conditions agissent sur la production des principes actifs[2] :

- Les conditions édaphiques (concernent le sol)
- Les conditions écologiques (la température, la précipitation, les vents...).

Nous avons procédé à une deuxième récolte le 02/07/2000 afin d'étudier l'influence des conditions climatiques sur les flavonoides.

Dans ce but on a effectué une extraction sur les trois parties récoltées dans cette période et on a calculé la Résolution frontale des composés et la teneur en classe flavonique.

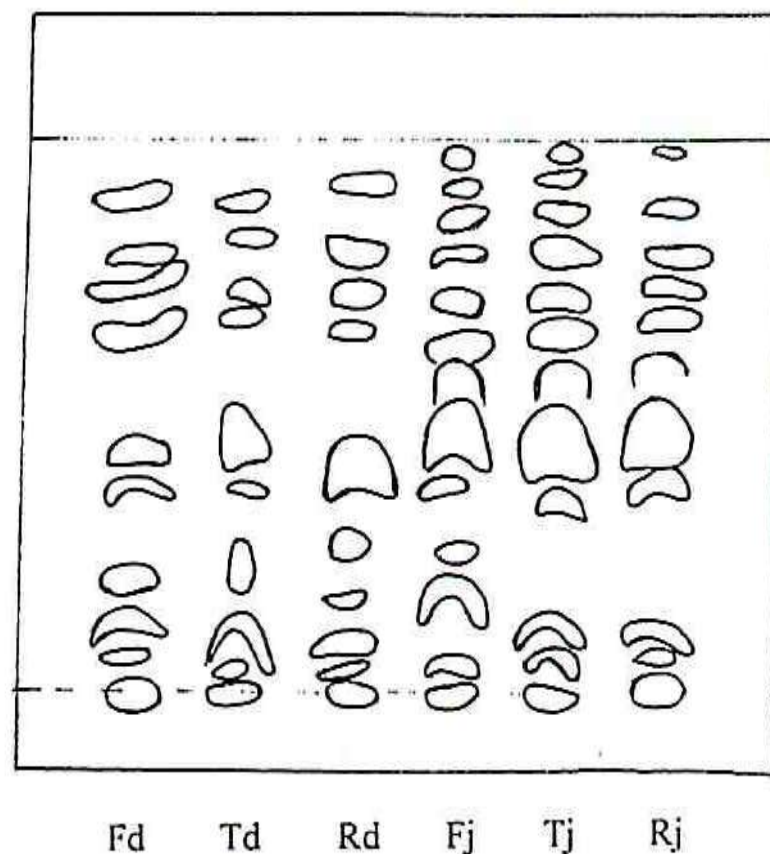
2-1/ Résultats et Discussions :

2-1-1/ Résultats de séparation sur CCM :

* pour les aglycones

TABLEAU IV-2 : Rf des deux extraits séparés sur gel de silice

<i>C₂H₄Cl₂/MeOH (95/5)</i> <i>Extrait de 1^{re} Récolte (décembre)</i>				<i>C₂H₄Cl₂/EtOH (95/5)</i> <i>Extrait de 2^{me} Récolte (juillet)</i>			
<i>Couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>	<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>
<i>Mauve</i>	0,90	0,93	0,94	<i>Mauve</i>	0,96	0,97	0,97
<i>Jaune</i>	0,82	0,84	0,83	<i>Bleu</i>	0,92	0,93	-
<i>J-Vert</i>	0,72	0,76	0,75	<i>Jaune</i>	0,86	0,88	0,88
<i>B-vert</i>	0,66	0,70	0,69	<i>Mv-clair</i>	0,79	0,79	0,78
<i>Mauve</i>	0,42	0,49	0,45	<i>J-vert</i>	0,72	0,72	0,73
<i>J-foncé</i>	0,38	0,39	0,31	<i>B-vert</i>	0,64	0,66	0,68
<i>orange</i>	0,21	0,24	0,20	<i>Jaune</i>	0,57	0,57	0,59
<i>Bleu</i>	0,11	0,12	0,10	<i>Mauve</i>	0,49	0,47	0,48
<i>J- brillée</i>	0,07	0,07	0,05	<i>J-foncé</i>	0,36	0,37	0,38
<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00	<i>Mauve</i>	0,27	-	-
				<i>Bleu</i>	0,20	0,16	0,14
				<i>J- brillée</i>	0,08	0,09	0,07
				<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00



F : feuilles
 T : tiges
 R : racines
 d : décembre
 j : juillet

FIG IV-1 : Résultats de CCM des aglycones en deux périodes
 Phase stationnaire : gel de silice
 Phase mobile : $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ / EtOH (95/5)

* pour les anthocyanes

TABLEAU IV-3 : Rf des composés séparés sur gel de silice

<i>EtOAc/MeOH/H₂O (10/1.5/1)</i> <i>Extrait de 1^{ère} Récolte (décembre)</i>				<i>EtOAc/MeOH/H₂O (10/1.5/1)</i> <i>Extrait de 2^{ème} Récolte (juillet)</i>			
<i>Couleur</i>	<i>Rf</i> <i>feuille</i>	<i>Rf</i> <i>tige</i>	<i>Rf</i> <i>racine</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rf</i> <i>feuille</i>	<i>Rf</i> <i>tige</i>	<i>Rf</i> <i>racine</i>
<i>Marron</i>	-	0,97	0,98	<i>Marron</i>	0,94	0,89	0,92
<i>Mauve</i>	-	0,83	0,82	<i>Bleu</i>	0,74	0,66	0,75
<i>Bleu</i>	0,69	-	0,70	<i>J-foncé</i>	0,58	-	0,62
<i>J-vert</i>	-	0,64	0,65	<i>Jaune</i>	0,43	0,44	0,49
<i>Jaune</i>	0,4	-	0,41	<i>B-vert</i>	0,38	0,40	0,43
<i>Vert</i>	0,22	-	-	<i>J-vert</i>	0,32	0,29	0,33
<i>Bleu</i>	0,07	0,072	0,06	<i>Mauve</i>	0,19	0,15	0,19
<i>J-vert</i>	0,00	0,00	0,00	<i>B-clair</i>	0,06	0,05	0,05
				<i>Jaune</i>	0,00	0,000	0,00

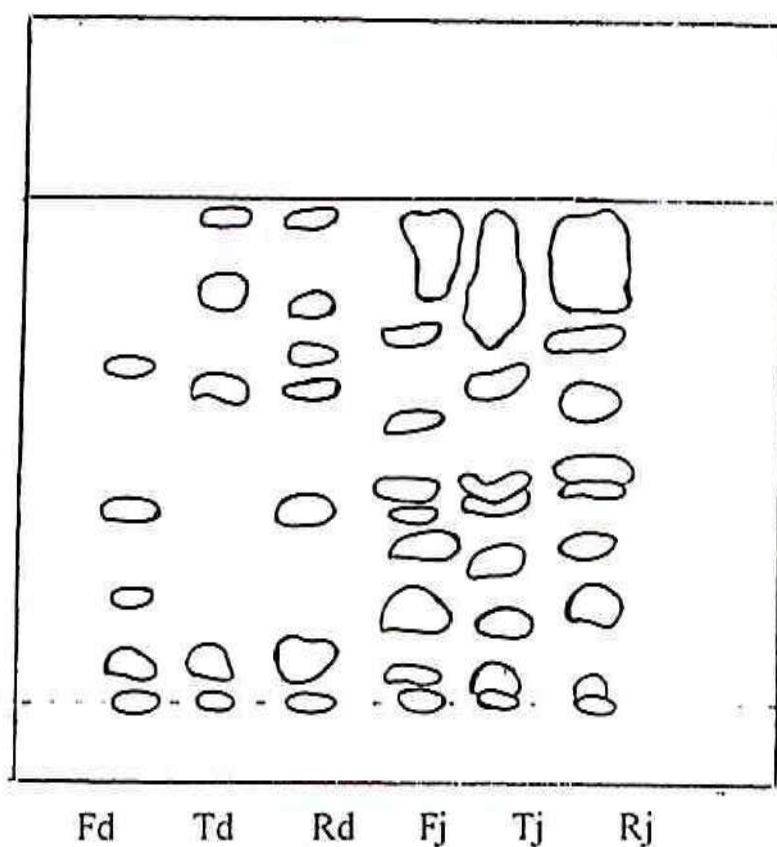


FIG IV-2 : Résultats de CCM des anthocyanes en deux périodes
 Phase stationnaire : gel de silice
 Phase mobile : EtOAc / MeOH / H₂O (10/1.5/1)

*** Interprétation**

D'après les tableaux IV-2 et IV-3 On remarque que l'extrait des aglycones au mois de juillet contient plus de produits en comparaison avec celui de décembre, dans les feuilles il y a 13 produits, dans les tiges on a 12 et dans les racines on trouve 11.

De même pour l'extrait des anthocyanes les parties les plus riches sont les feuilles et les racines où on remarque l'absence d'un produits dans les tiges de couleur jaune foncé et de Rf entre 0,58 et 0,62 respectivement dans les deux autre parties.

2-1-2/ la teneur en flavonoides dans les deux périodes :

En effectuant une analyse quantitative sur les différentes classes flavoniques dans deux périodes différentes, pour les aglycones on a obtenu les résultats suivants :

TABLEAU IV-4: Teneur en aglycones

L'ORGANE LA PERIODE	Feuille (mg/g)	Tige (mg/g)	Racine (mg/g)
<i>Décembre</i>	0,274	0,09	0,16
<i>Juillet</i>	0,031	0,006	0,013
<i>La moyenne</i>	0,153	0,048	0,087
<i>L'écart type</i>	0,12	0,042	0,074
<i>Coefficient de dispersion</i>	78 %	87 %	85 %

TABLEAU IV-5 : Teneur en anthocyanes

L'ORGANE LA PERIODE	Feuille (mg/g)	Tige (mg/g)	Racine (mg/g)
	<i>HCl 2N</i>	<i>HCl 2N</i>	<i>HCl 2N</i>
<i>Décembre</i>	1,381	0,99	0,307
<i>Juillet</i>	0,72	0,34	0,24
<i>La moyenne</i>	1,05	0,67	0,27
<i>L'écart type</i>	0,33	0,33	0,034
<i>Coefficient de dispersion</i>	31 %	49 %	12 %

TABLEAU IV-6: Teneur en c-glycosides

L'ORGANE LA PERIODE	Feuille (mg/g)	Tige (mg/g)	Racine (mg/g)
	<i>BuOH</i>	<i>BuOH</i>	<i>BuOH</i>
<i>Décembre</i>	8,058	7,466	7,616
<i>Juillet</i>	6,58	4,54	3,029
<i>La moyenne</i>	7,319	6,003	5,323
<i>L'écart type</i>	0,739	1,46	2,29
<i>Coefficient de dispersion</i>	10 %	24 %	43 %

*** Interprétation :**

Nous avons noté que la teneur différentiel des aglycones égale ou 0.153 ± 0.12 mg/g pour les feuilles, 0.148 ± 0.042 mg/g pour les tiges et 0.087 ± 0.074 mg/g pour les racines.

D'autant que la teneur absolue des anthocyanes dans la phase acide de chaque partie de la matière végétale varie :

- de 0.72 à 1.381 mg/g avec une moyenne de 1.05 ± 0.33 mg/g pour les feuilles
- de 0.34 à 0.99 mg/g avec une moyenne de 0.67 ± 0.33 mg/g dans les tiges
- de 0.24 à 0.307 mg/g avec une moyenne de 0.27 ± 0.034 mg/g

La teneur des C-glycosides :

- dans les feuilles variés de 6.58 à 8.058 mg/g avec une moyenne de 7.319 ± 0.739 mg/g.
- dans les tiges allant de 4.54 à 7.466 mg/g avec une moyenne de 6.003 ± 1.46 mg/g.
- dans les racines allant de 3.029 à 7.616 mg/g avec une moyenne de 5.323 ± 2.29 mg/g.

D'après les résultats on remarque que la composition chimique de la plante au mois de juillet est totalement différente de celle du mois de décembre et cela est due à des conditions climatiques qui ont un effet sur les végétaux par exemple température élevée des zones arides où mois de juillet augmente le taux d'évaporation de l'eau des sols. Et d'après le Dr Majeed R. Al-Hilli et col l'eau est le premier agent qui entre dans la production de chlorophylle et nous savons que la production des composés flavoniques en dépendent. D'autant plus la lumière très élevée (forte) diminue la production de chlorophylle.

D'après la bibliographie les conditions édaphiques ont aussi un effet sur la production des principes actifs par exemple la teneur du sol en différents éléments comme l'azote qui entre dans la production des alcaloïdes et de l'eau qui diminue la température des organes intérieurs et qui participe dans la synthèse de la chlorophylle.

La plante en période de fluorescence de (janvier – novembre) diminue la production des composés phénoliques est en accord avec les résultats bibliographiques.

D'autant que la plante produit certains composés dans des périodes bien précises et cela peut être du à des facteurs héréditaire, car la plante au stade de fluorescence dans cette période (les conditions climatique telle que la température, la précipitation...) influe sur les enzymes responsables de la production des flavonoides qui a leur tour attire les insectes pour la dispersion et pollinisation.

3/ Conclusion :

Les résultats obtenus nous donne une idée que le contenu phénolique des végétaux est influencé non seulement par des facteurs extrinsèques telle que la température, la lumière, la précipitation, le sol etc.... mais peut être aussi être affecté par des facteurs intrinsèques propres au végétal telle que la floraison ou la fructification.

Conclusion générale

Conclusion générale

A l'issue de ce travail consacré à la contribution à l'étude des flavonoides dans la plante « *Cynodon Dactylon* » nous pouvons rappeler les principaux résultats obtenus :

- Les tests chimiques nous ont permis d'identifier l'existence des composés flavoniques.
- D'après l'étude quantitative des classes flavoniques au sein des parties de chiendent on peut estimer que les feuilles sont la partie la plus riche en composés flavoniques.
- Le dosage nous amène à conclure que la partie prédominante se sont les c-glycosides.
- On a identifier avec l'HPLC l'existence des produits E₂, E₈ et E₁₀ dans l'extrait des aglycones et les produits E₆ et E₉ dans l'extrait des hétérosides.
- l'étude des flavonoides dans deux période nous amène à conclure que la composition chimique de la plante au mois de juillet est totalement différente de celle du mois de décembre.

BIBLIOGRAPHIE

1. E.C Bate Smith ; *Biochem.J.* 1954, 58, 126-132.
2. UNSCO ; « les plantes médicinales des région aride » 1960, éd l'organisation des notions unies, Paris 7^e.
3. R. Negre ; « petite flore des régions arides du Marococcidental » Tome I, 1961 Paris VII.
4. P.Boulanger et Polonvski ; « Traite de biochimie générale » Tome II, 1962, éd Masson et C^{ie}, Paris VI^e, 349-370.
5. J.B.Harborne ; « chromatography of phenolic compounds » 1963, éd departement of botany university of reading, England, 759-778.
6. J.B.Harborne ; *Academic Press*, New York 1967, 1-3.
7. P.Binet et J.P.Brunel ; « physiologie végétale » Tome II, 1968, Paris VI^e, 766- 776.
8. I.Raphael ; « natural products a laboratory guide » 1969, éd Academic Press, London, New York and San Francisco, 1-23.
9. M.Javillier ; « traite de biochimie générale » Tome III, 1969, Paris VI^e, 705-763.
10. R.Gayon ; « les composés phénoliques des végétaux », 1969, éd Dunod-Paris, 254.
11. J. Mabry et Col ; « the systématique identification of flavonoids », 1970, éd Springer verlag *Berlin*, New York, 313.
12. J.M.Tedder et Col ; « bosic organic chemistry » Part IV, 1972, London, New York, Sydney, Toronto, 184-192.
13. J.Tronchet; *J.Bull Soc. Bot. France*, 1972, 119 , 555-570.
14. R.Brouillard et B.Dclaporte; *J. Am. Chem. Sec* 1977, 99 ,8461-8468 .
15. M..paris et M.Hurabelle ; « abrégé de matière médicale, pharmacognosie » Tome I, 1980, éd Pr. Y. Cohen. 280.
16. I.Mc Murrough ; *Journal of chromatography* 1981, 218 , 683-693.
17. R.R.Paris et M^{me} H.Moyse ; « matière médicale » Tome II, 1981, éd Masson Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Rio de Janiro, 10- 29.
18. J.Reynaud et Col; *J.Phytochemi* 1982, 21, 10 , 2601-2605.
19. R.Brouillard ; « anthocyanines as food colors », 1982, éd P-Markakis Academic Press, New York, 1-4.
20. J.A.Duke ; « Handbook of Energy Crops » 1983, Washington, 1-5.
21. M.Hadj Mahammed; Thèse de magister (U.S.T.H.B), Alger, 1985, 121.
22. H.Brasseur et Col; « propretés antiradcalaires antilipoperoxydantdes flavonoides », 1986, éd Colloque du groupe polyphénols, Montepellier, 557-559.
23. R.G.Terrak ; Thèse de magister (U.S.T.H.B), Alger, 1987, 150.
24. S.Ouafi, Thèse de magister (U.S.T.H.B), Alger, 1987, 117.

25. J.B.Harborne et R.J.Grayer ; « The flavonoids advances in research since 1980 », 1988, éd J.B.harborne champman and Hall, London, 1-20.
26. M.Ghbor, « plants flavonoids in biology and médecine », 1988, éd V.Cody et Col, Inc, New York, 1-15.
27. M.Stobiecki; *J.Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1988, 15, 589-594.
28. R.Majeed et A.Hikmat; « plant ecology », 1989, éd Université El Maoussele, Irak, 71-157.
29. F.Baba Aissa ; « les plantes médicinales en Algérie », 1991, éd Coédition Bouchène et Ad.Diwan, Alger, 47-48.
30. R.Brouillard et Col ; *J-Chem. Soc Perkin Trans* 1991, 2, 1235-1241.
31. D.Mouamed Ouali ; « Résumé de la communication » URZA BP Alger gare 1993.
32. J.Bruneton ; « pharmacognosie, phytochimie plante médicinales » 2^{ème} édition 1993, 264-293.
33. Romart ; « la nouvelle phytothérapie », Publicis Méditerranée éd R.C. 83 B320 1993.
34. W.Heller et G.Forkmann ; éd J.B.Harborne champman and Hall, London 1993, 499-5
35. الدكتور شكري ابراهيم سعد "النباتات الزهرية نشاطها، تطورها، تصنيفها" 1994، مصر ، 207 - 230
36. L.Segni ; Thèse de magister Institut de chimie industrielle, Galuma 1994,61.
37. M.Weidenborner end H.C.Jha ; *J.Pestic Sci* 1994, 38, 47-351
38. R.Brouillard and O.Dangles ; *J.Food Chem* 1994, 51, 65-371.
39. M .Penelope Ody ; « les plantes médicinales », 1995, Paris, 118-119.
40. M.Boukhat ; Mémoire d'ingénieur (INFS/AS), Ouargla 1996, 11, 51.
41. N.Gheraf ; Thèse de magister U.Geluma 1997, 61.
42. Z.Zerrouki ;Mémoire d'ingénieur (INFS/AS) 1997, 40-68, 94.
43. D.Buranie ; « fleurs de méditerranée » 1998, éd Phlippe Brunet Mathilde Majorl, Séverine Cuzin, Paris, 320.
44. B.Benthin et Col ; *Journal of chromatography A* 1999, 837 , 211-219
45. Y.Moulay; Mémoire d'ingénieur institut de chimie industrielle C.U.Ourgla 2000, 92.

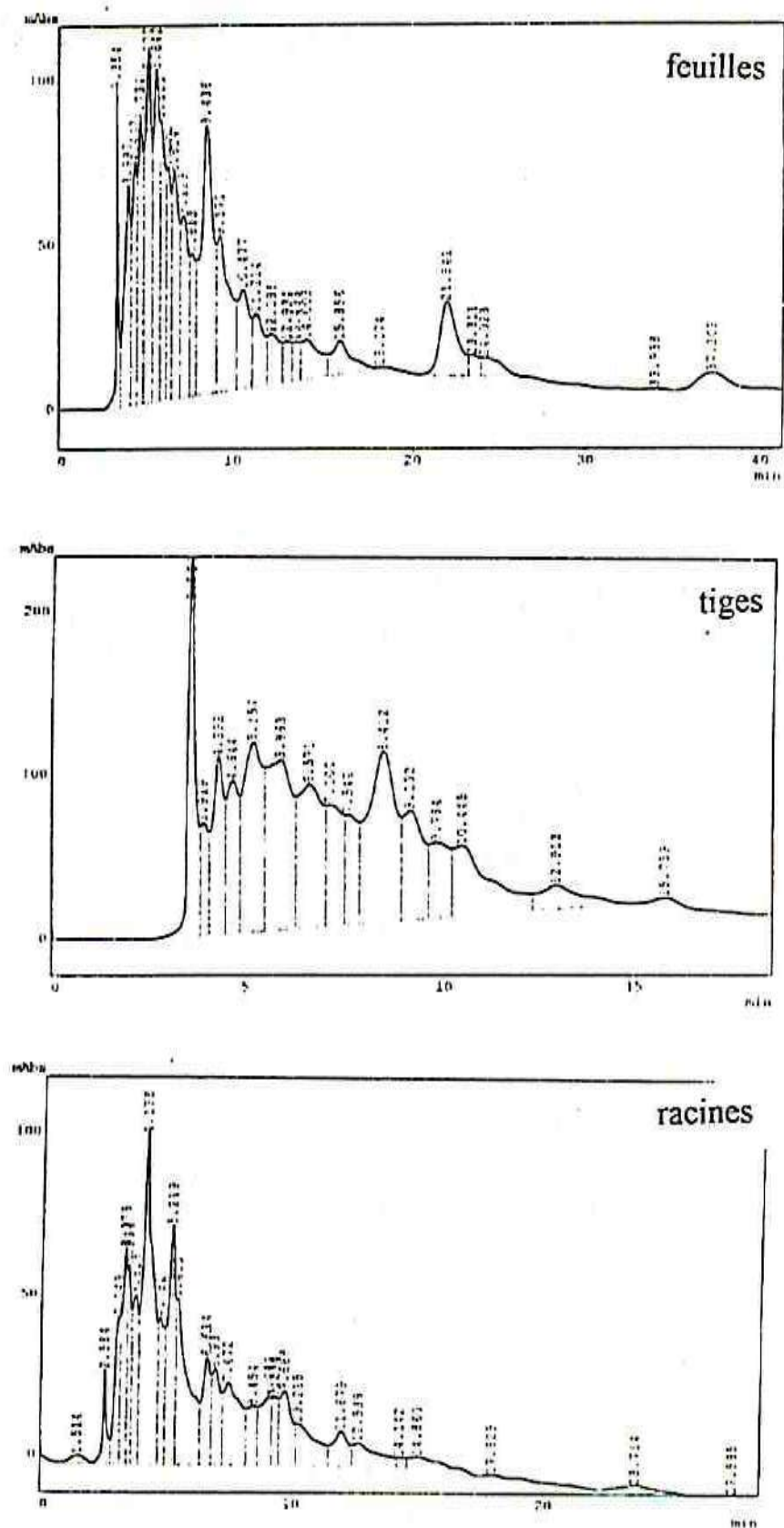
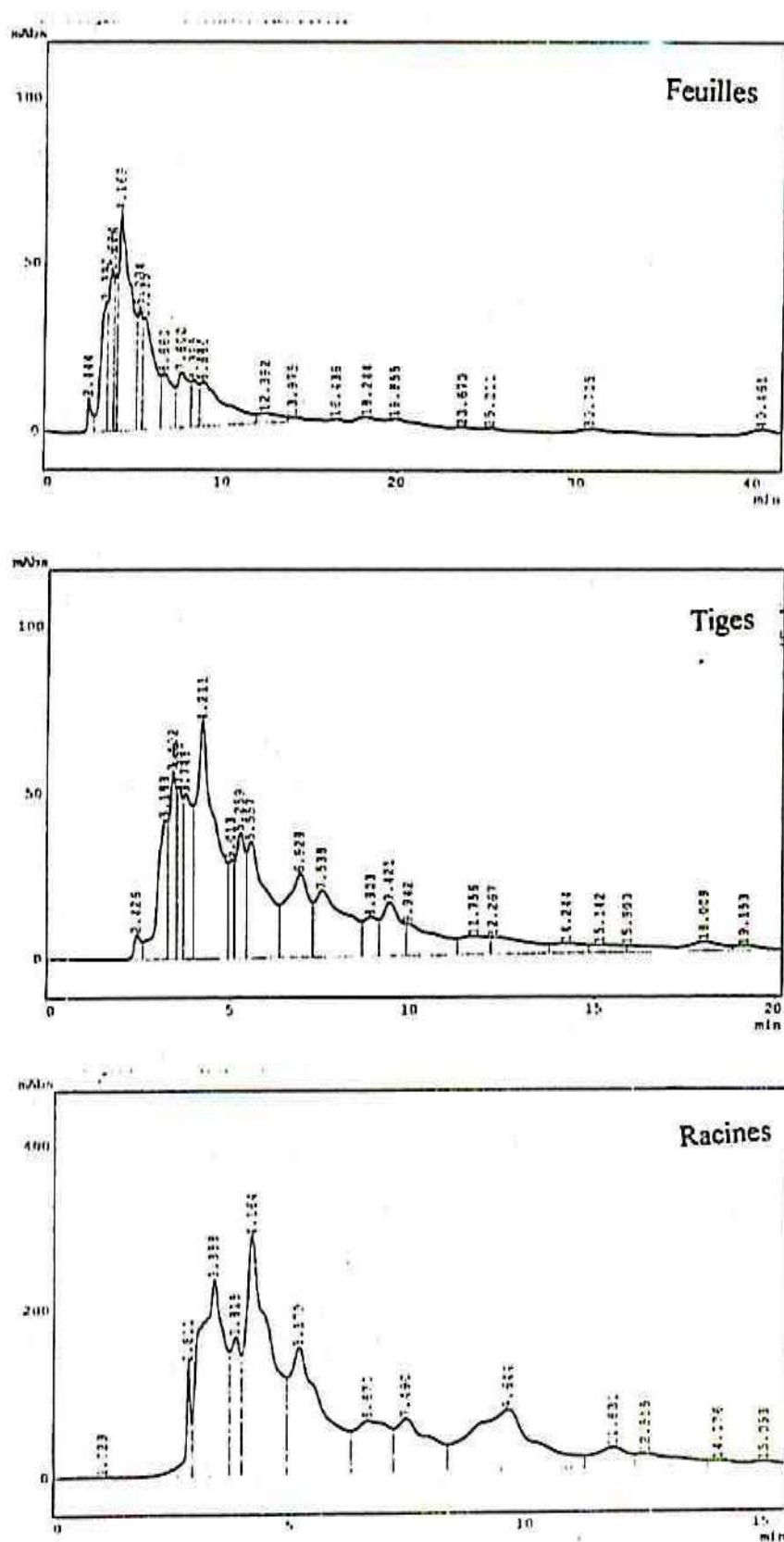


FIG II-6 : Chromatogramme HPLC des anthocyanes en mode isocratique
 $\lambda = 254 \text{ nm}$; Phase mobile : MeOH / H₂O / CH₃COOH (50:50:5)
 Phase stationnaire : colonne : C18 (4.6* 150 mm ; 3.5 m)



*** Résultats des de l'HPLC pour les trois classes flavoniques dans les 1^{er} conditions :**

1/ Pour l'extrait des aglycones :

TABLEAU N°1 : Temps de rétention des composés aglyconiques

<i>Comps</i>	<i>Organes</i>	<i>Feuilles</i>	<i>Tiges</i>	<i>Racines</i>
		<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>
1		0,641	2,500	2,512
2		1,561	3,314	3,391
3		2,280	3,923	4,690
4		3,198	4,666	5,127
5		3,666	5,071	6,027
6		4,453	6,971	6,981
7		4,939	8,135	8,217
8		6,731	9,167	9,176
9		7,172	9,720	9,732
10		7,757	11,656	-
11		8,933	15,031	-
12		9,492	-	-
13		11,384	-	-
14		13,073	-	-
15		14,510	-	-

2/ Pour l'extrait des anthocyanes :

TABLEAU N°2 : Temps de rétention des composés anthocyaniques

<i>Comps</i>	<i>Organes</i>	<i>Feuilles</i>	<i>Tiges</i>	<i>Racines</i>
		<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>
1		2,537	2,435	2,446
2		3,219	3,159	3,158
3		3,811	3,940	4,489
4		4,825	5,073	5,803
5		6,554	6,567	8,142
6		7,125	8,123	9,073
7		8,800	9,605	9,681
8		9,606	12,055	-
9		-	12,958	-
10		-	16,687	-
11		-	20,790	-

3/Pour l'extrait des hétérosides :

TABLEAU N°3 : Temps de rétention des composés hétérosidiques

<i>Comps</i>	<i>Organes</i>	<i>Feuilles</i>	<i>Tiges</i>	<i>Racines</i>
		<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>	<i>tr</i> <i>(min)</i>
1		2,459	2,474	2,494
2		3,144	3,055	3,150
3		3,933	3,188	6,446
4		4,469	3,402	7,691
5		4,949	3,782	9,056
6		5,873	4,210	9,464
7		7,943	4,795	12,901
8		9,710	5,257	-
9		12,757	5,533	-
10		13,296	6,794	-
11		17,909	7,502	-
12		-	8,361	-
13		-	10,542	-

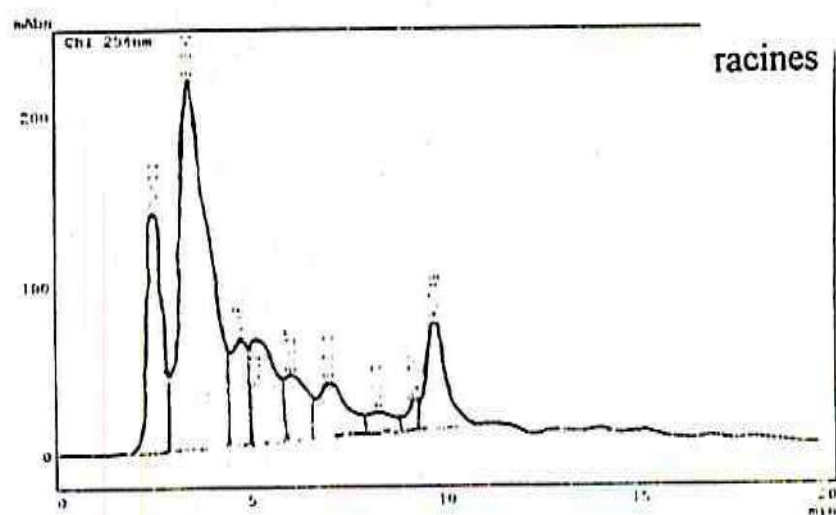
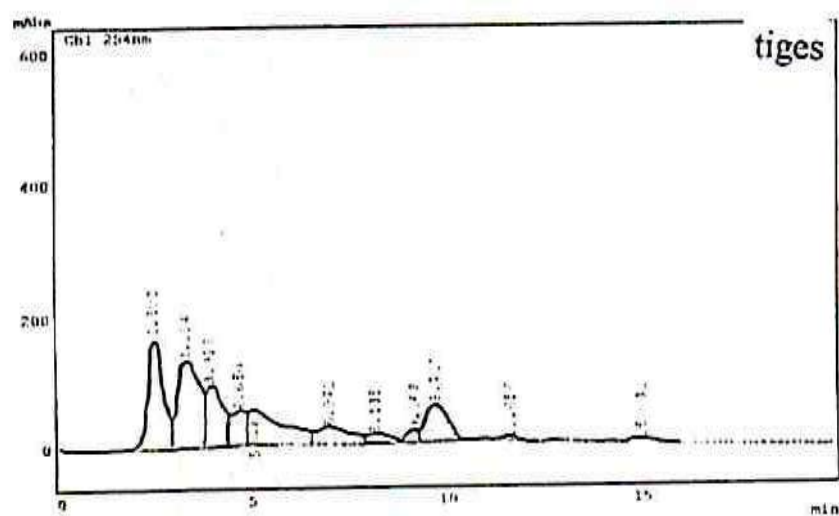
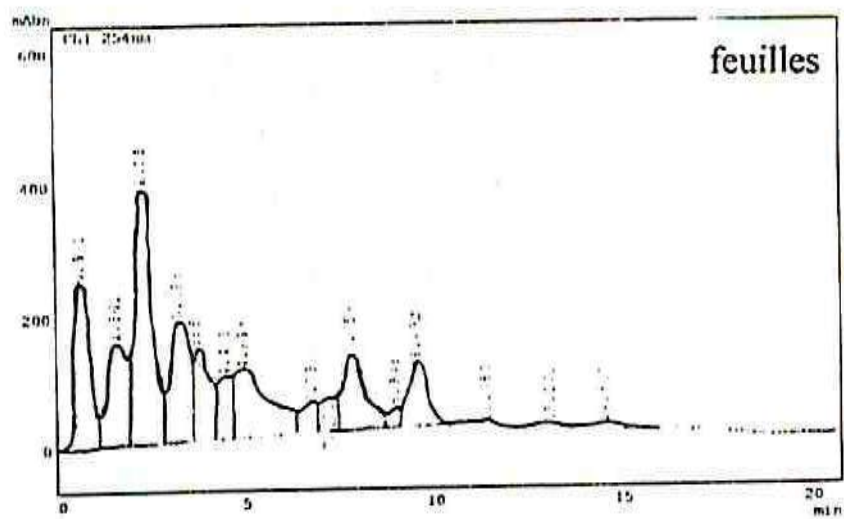


FIG 1 : Chromatogramme HPLC des aglycones en mode isocratique $\lambda = 254 \text{ nm}$
 Phase mobile : Acétonitrile / eau (1% d'acide acétique) (32/68)
 Phase stationnaire : colonne : C18 (4.6* 150 mm ; 3.5 m)

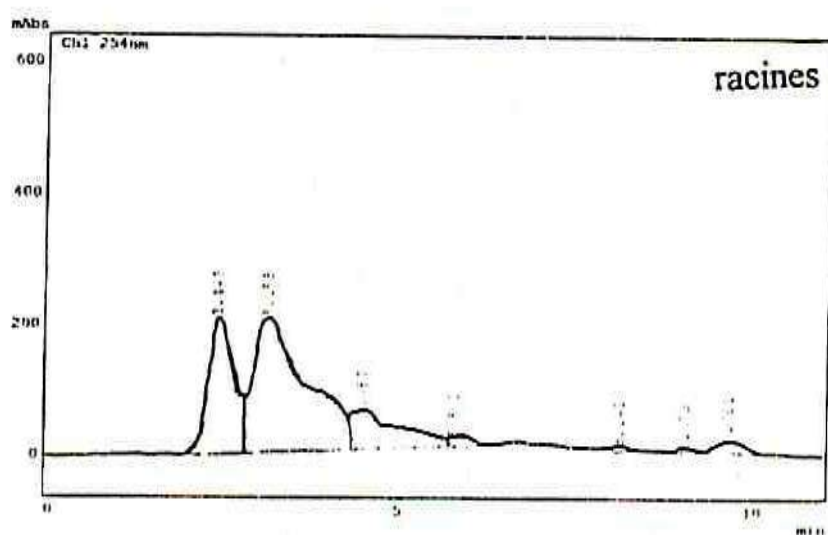
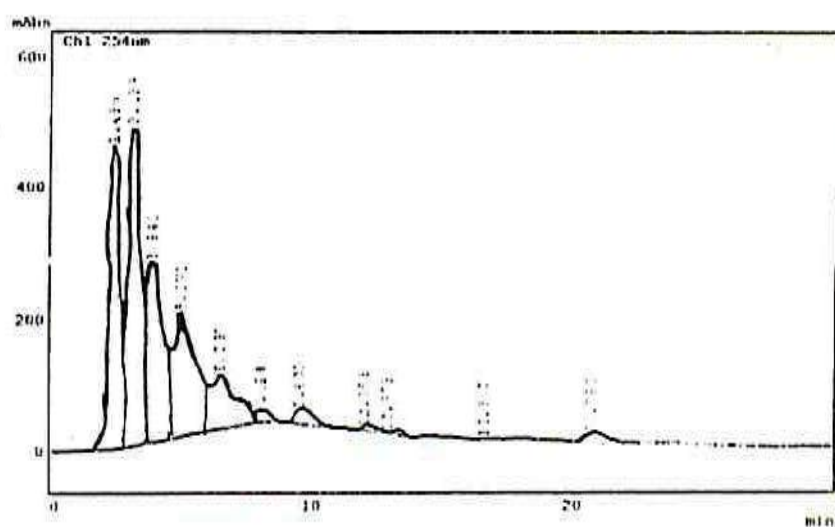
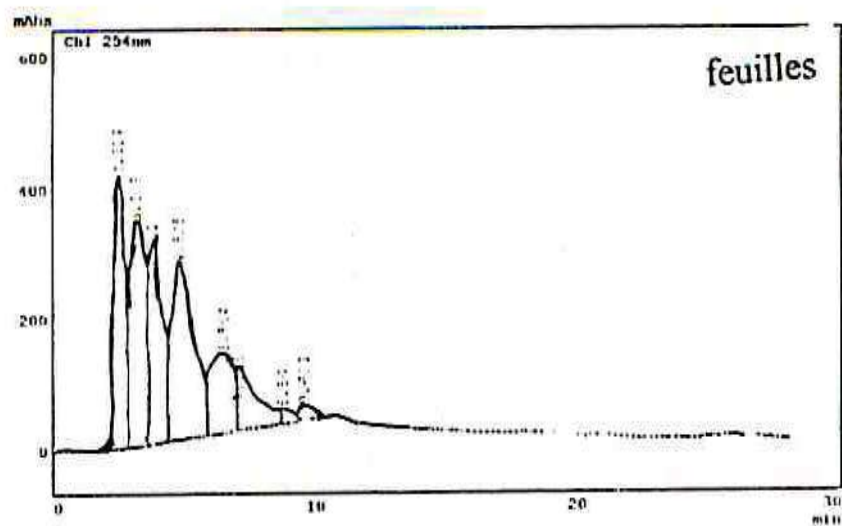


FIG 2 : Chromatogramme HPLC des anthocyanes en mode isocratique $\lambda = 254 \text{ nm}$
 Phase mobile : Acétonitrile / eau (1% d'acide acétique) (32/68)
 Phase stationnaire : colonne : C18 (4.6* 150 mm ; 3.5 m)

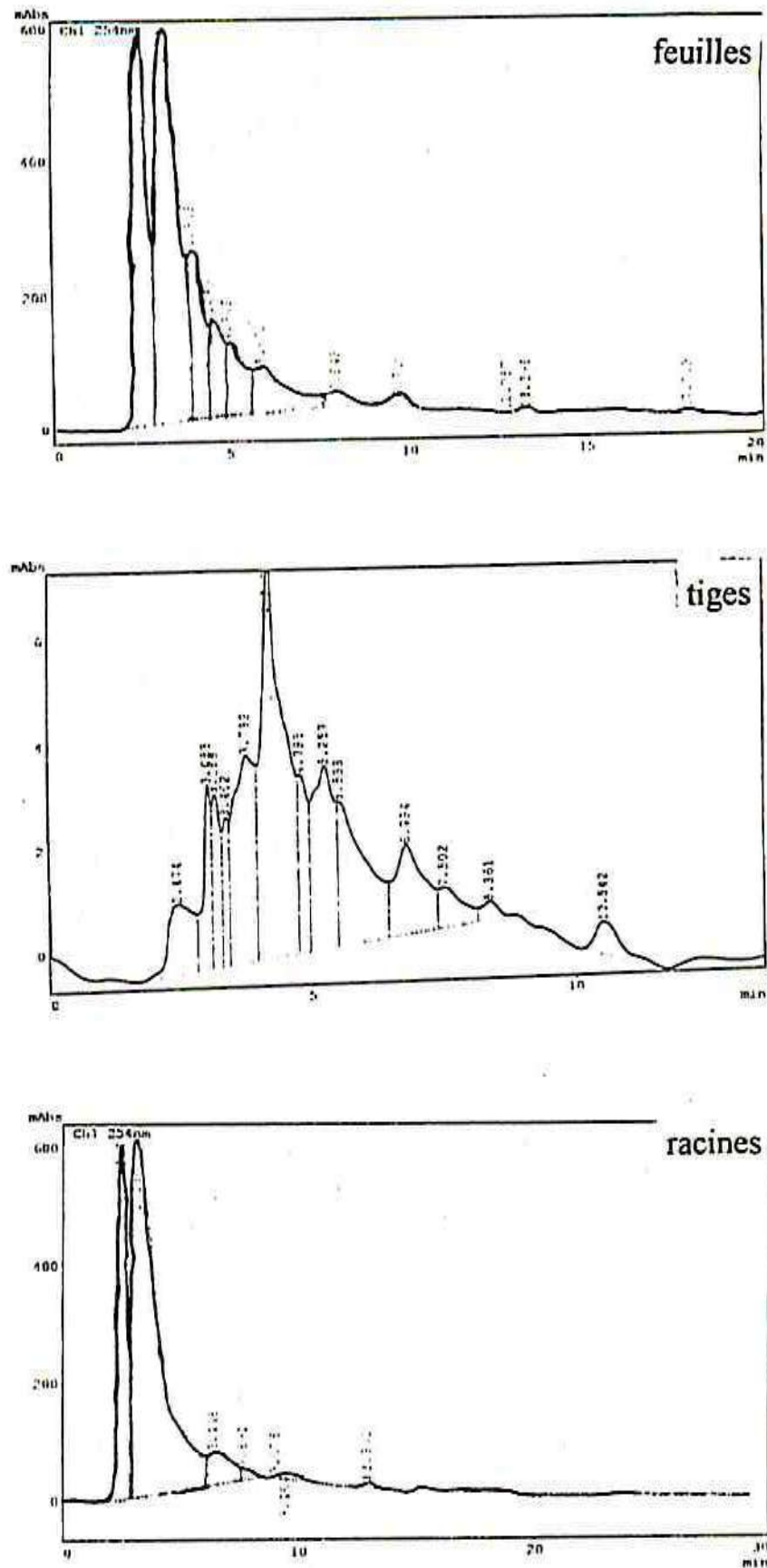


FIG 3 : Chromatogramme HPLC des hétérosides en mode isocratique $\lambda = 254 \text{ nm}$
 Phase mobile : Acétonitrile / eau (1% d'acide acétique) (32/68)
 Phase stationnaire : colonne : C18 (4.6* 150 mm ; 3.5 m)

* Profil CPG des solvants initiales (Méthanol, Ethanol) :

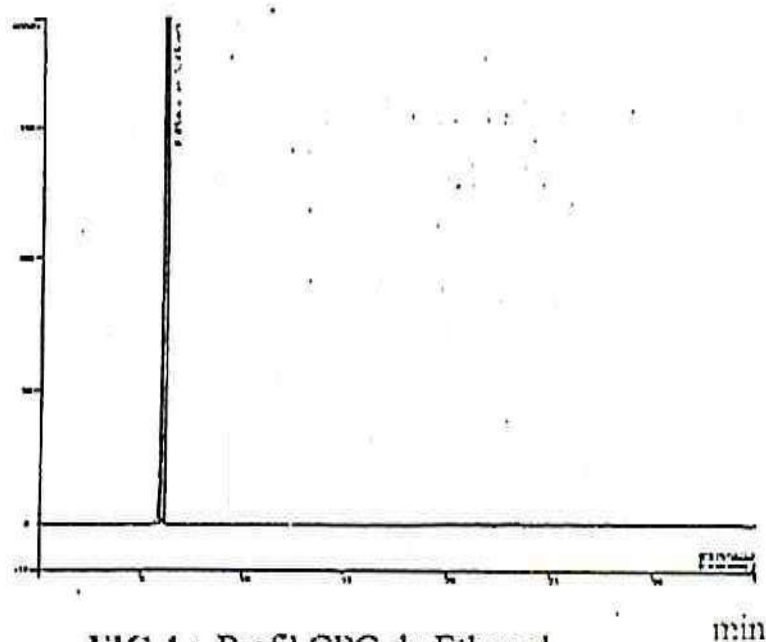


FIG 4 : Profil CPG de Ethanol
Phase mobile : gaz Hélium
Phase stationnaire : CP-Sil 5 CB

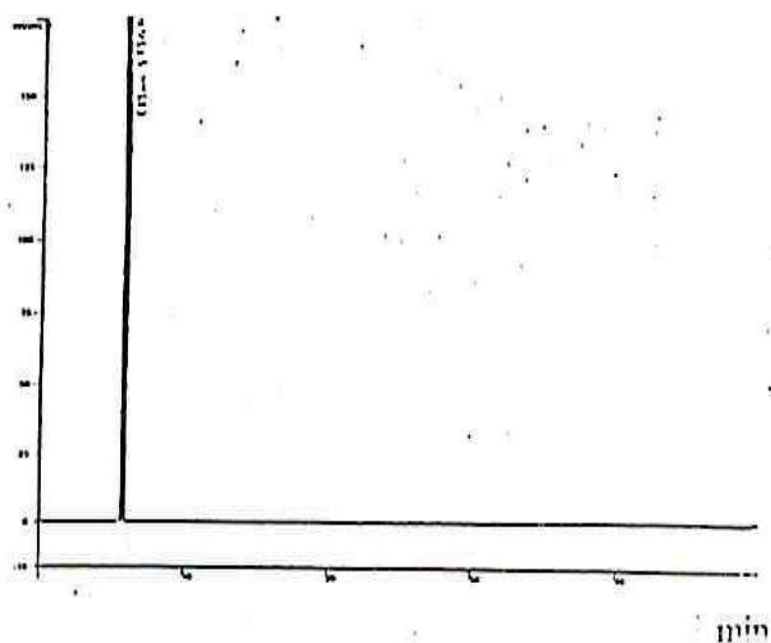


FIG 5 : Profil CPG de Méthanol
Phase mobile : gaz Hélium
Phase stationnaire : CP-Sil 5 CB

* Les spectre UV des anthocyanes et les hétérosides :

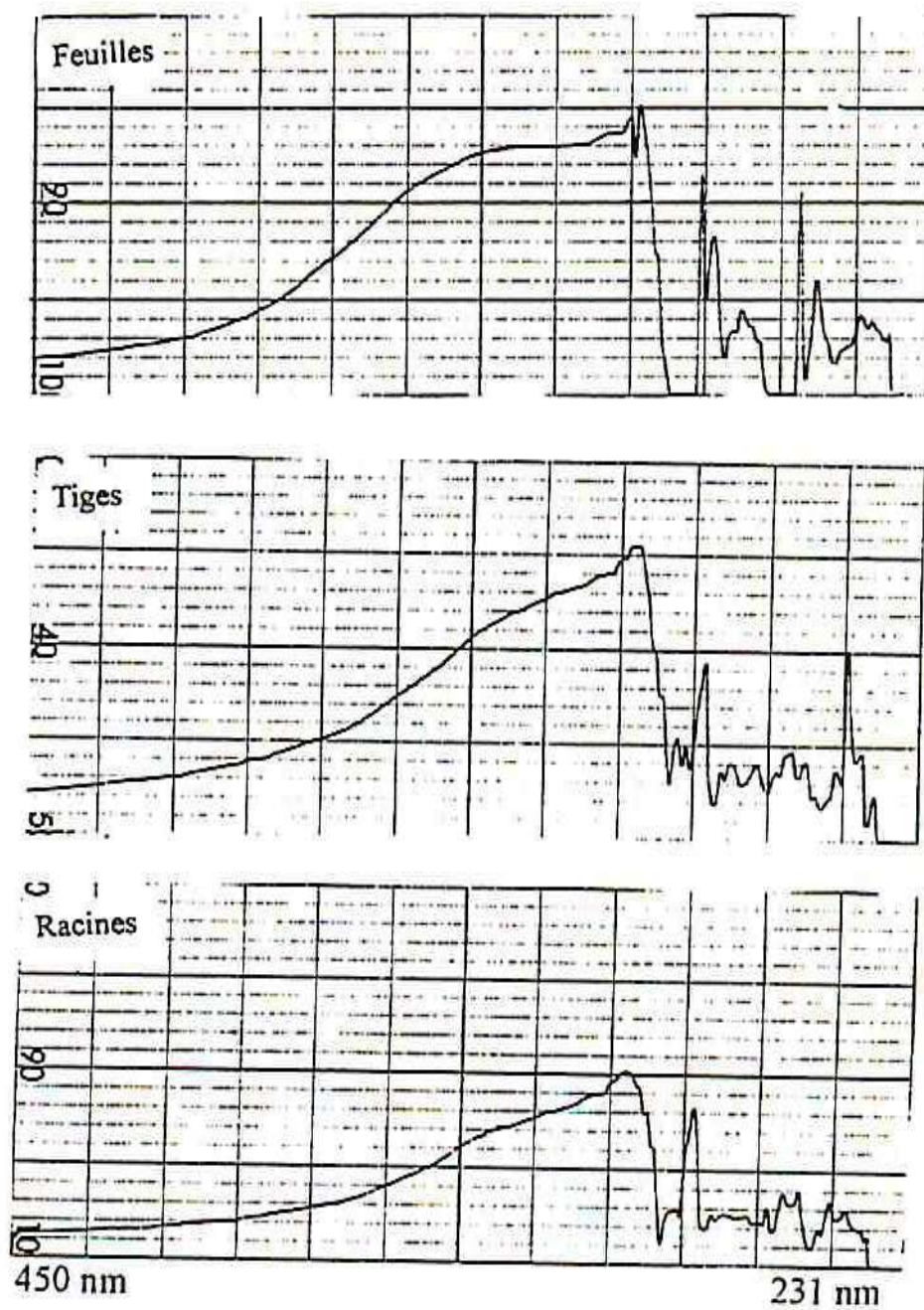


FIG III-2 : Spectre UV des anthocyanes
 $\lambda = 231 \text{ à } 450 \text{ nm}$

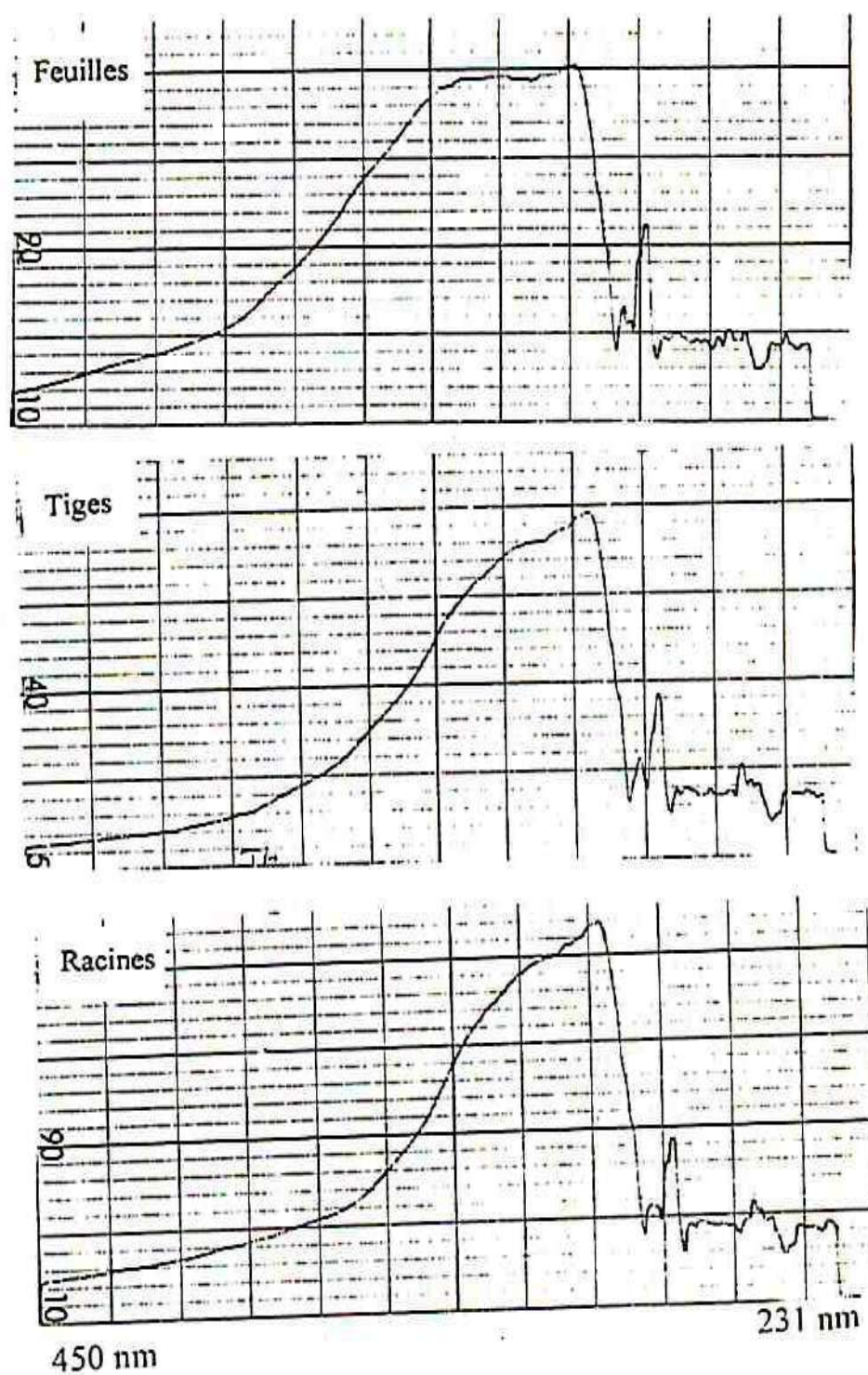


FIG III-3 : Spectre UV des hétérosides
 $\lambda = 231 \text{ à } 450 \text{ nm}$

III-1-4/ L'ajout de l'ammoniaque (NH₃) :

On a pulvérisé les plaques de CCM par l'ammoniaque

A/ Pour les aglycones :

Tableau N°4 : Couleur des composés aglyconiques avant et après l'ajout de l'ammoniaque

<i>C₂H₄Cl₂/EtOH (95/5)</i>				<i>Vapeurs de NH₃</i>	<i>Caractérisation</i>
<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>	<i>Couleur sous UV</i>	<i>Type de flavonoïde</i>
<i>Mauve</i>	0,9	0,88	0,92	<i>Jaune</i>	<i>Flavones-5(OH) et 4'(OH)</i>
<i>J-Vert</i>	0,72	0,71	0,73	<i>Marron</i>	-
<i>Jaune</i>	0,53	0,51	0,52	<i>Marron</i>	-
<i>Mauve</i>	0,41	0,39	0,42	<i>Bleu</i>	<i>Flavanones</i>
<i>Jaune</i>	0,36	0,34	0,33	<i>Jaune</i>	<i>Flavonols-3(OH)</i>
<i>orange</i>	0,20	0,19	0,21	<i>J-vert</i>	-
<i>Bleu</i>	0,11	0,12	0,10	-	<i>Isoflavones-5(OH)</i>
<i>J-brillée</i>	0,07	0,07	0,05	<i>Jaune</i>	-
<i>Marron</i>	0,00	0,00	0,00	-	-

B/ Pour les anthocyanes :

Tableau N°5 : Couleur des composés anthocyaniques avant et après l'ajout de l'ammoniaque

<i>EtAc /MeOH/ H₂O (10/1,5/1)</i>				<i>Vapeurs de NH₃</i>	<i>Caractérisation</i>
<i>Gel de silice</i>					
<i>Couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>RF racine</i>	<i>Couleur sous UV</i>	<i>Type de flavonoïde</i>
<i>Marron</i>	-	0,96	0,89	<i>J-vert</i>	?
<i>Mauve</i>	0,80	0,83	0,82	<i>B-vert</i>	?
<i>Jaune</i>	-	-	0,75	-	?
<i>Bleu</i>	0,65	-	0,63	<i>Bleu</i>	?
<i>J-vert</i>	-	0,52	0,50	-	?
<i>J-pale</i>	0,32	-	0,33	-	?
<i>Vert</i>	0,25	-	-	-	?
<i>Bleu</i>	0,06	0,07	0,06	-	?
<i>J-vert</i>	0,00	0,00	0,00	-	?

C/ Pour les hétérosides :

Tableau N°6 : Couleur des composés hétérosidiques avant et après l'ajout de l'ammoniaque

<i>EtOAc/MeOH/H₂O (10/1,5/1)</i>				<i>Vapeurs de NH₃</i>	<i>Caractérisation</i>
<i>Gel de silice</i>					
<i>couleur</i>	<i>Rf feuille</i>	<i>Rf tige</i>	<i>Rf racine</i>	<i>Couleur sous UV</i>	<i>Type de flavonoïde</i>
<i>R-orange</i>	0,97	0,97	-	-	?
<i>Jaune</i>	-	-	0,96	-	?
<i>Jaune</i>	0,88	0,85	0,88	-	?
<i>J-vert</i>	-	-	0,82	-	?
<i>Mauve</i>	0,77	0,77	0,76	<i>J-vert</i>	<i>flavonols-3,4',5(OH) + ose</i>
<i>J-clair</i>	0,73	0,74	-	-	?
<i>J-foncé</i>	0,68	0,69	0,69	-	?
<i>Jaune</i>	0,62	0,63	0,59	<i>J-clair</i>	<i>flavonols-5(OH) libre</i>
<i>B-clair</i>	0,54	-	0,49	-	?
<i>Jaune</i>	0,45	-	0,42	<i>Bleu</i>	?
<i>B-foncé</i>	0,30	0,29	0,31	<i>Jaune</i>	?
<i>Jaune</i>	0,17	0,19	0,16	-	?
<i>Mauve</i>	0,13	-	-	<i>Orange</i>	?
<i>Jaune</i>	-	0,08	-	-	?
<i>Bleu</i>	0,05	-	0,045	-	?
<i>Jaune</i>	0,00	0,00	0,00	-	?

* Les Structures des Etalons :

