

# دعاء

اللهم لا تجعلنا نصابج بالغرور إذا نجحنا و لا باليأس إذا أخفقتنا و ذكرنا

أن الإخفاق هو التجربة التي تسبق النجاح.

اللهم إذا أعطيتنا نجاحاً فلا تأخذ تواضعنا و إذا أعطيتنا تواضعاً فلا تأخذ

اعتزازنا بكرامتنا.

اللهم اختم بالسعادة أجالنا و حقق بالزيادة آمالنا و اقترن بالعافية

غرورنا و أعمالنا.

ربنا تقبل منا يا رب العالمين.

## REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu le Tout Puissant de m'Avoir Donné le courage, la volonté et la patience durant notre cursus universitaire.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) dirigé par M<sup>me</sup> le Professeur **KABOUCHÉ Zahia**. Je tiens à la remercier pour m'avoir accueillie si chaleureusement au sein de l'équipe de recherche ainsi que pour sa disponibilité.*

*Je remercie le docteur **D. BERREHAL** pour m'avoir proposé ce sujet ainsi que pour son soutien et ses conseils tout au long de ces mois.*

*Nous remercions également aux membres du jury **Dr. A.KHALFALLAH, Dr. D. BERREHAL, Dr .N. BOUTAGHANE** d'avoir accepté de juger ce travail malgré leurs multiples obligations.*

*Je remercie l'ensemble de l'équipe de recherche pour leur sympathie et leur expérience qui m'ont aidée afin de réaliser ce travail surtout Monsieur **Hicham SERAA** et mesdemoiselles **Sara BECHKRI**, Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire qui ont sa crée l'atmosphère, et que j'ai eu la chance de les côtoyer particulièrement mes sœurs **Kenza** et **Nadia**.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail*

*Nous remercions grandement nos amis pour leur soutien qui fut très important pour moi.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire :*

*A Mes Frères Chers Parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouvent dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A mes frères (Walid et Abdallah) et ma sœur (Yasmine).*

*Et mon mari (seif Eddine) et sa famille.*

*Et particulièrement : à mes meilleures amies Kenza, Nadia*

*Hanane, Sara*

*A mes oncles et chères tantes et leurs enfants, chacun par son nom.*

*A toute la famille Boukerzaza, à mes ami(e)s, chacun(e) par son nom.*

*A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans l'accomplissement de ce mémoire.*

*Hadjer*

## *Abréviations et symboles*

**CC** : chromatographie sur colonne  
**CCM** : chromatographie sur couche mince  
**CD<sub>3</sub>OD** : méthanol deutéré  
**d** : doublet  
**dd** : doublet des doublet  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DPPH** : 1,1-diphénol-2-picrylhydrzyl  
**DO** : densité optique  
**D**: dilution  
**g** :gramme  
**HPLC**: High Performance Liquid Chromatography  
**Hz** : hertz  
**J** : constante de couplage  
**m** : masse  
**ml** : millilitre  
**mg** : milligramme  
**mn**: minute  
**nm** : nano maitre  
**P** : produit  
**ppm** : partie par million  
**Rf**: rapport frontal  
**RMN <sup>1</sup>H**: Résonance magnétique nucléaire du proton  
**SI** : système d'élution I  
**SII** : système d'élution II  
**UV** : ultra violet  
**V** : volume  
 $\lambda$ : longueur d'onde  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium

## *Liste des figures*

<i>N°</i>	<i>Titre</i>
<b>Chapitre I : aperçu bibliographique</b>	
<b>Figure 1</b>	Lés déférent types de la famille des Asteraceae.
<b>Figure 2</b>	Inflorescence en capitule.
<b>Figure 3</b>	Quelque Espèces de genre <i>Evax</i> .
<b>Figure 4</b>	Squelette de base des flavonoïdes.
<b>Figure 5</b>	Représentation des principales class et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle.
<b>Figure 6</b>	Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.
<b>Chapitre II : Etude phytochimique d'une plante du gerne Evax.</b>	
<b>Figure 1</b>	Protocole d'extraction de la plante.
<b>Figure 2</b>	Le profile HPLC de la phase acétate.
<b>Figure 3</b>	Organigramme de séparations chromatographiques effectuées sur l'extrait acétate d'éthyles de la plantes.
<b>Figure 4</b>	Série spectrale UV –Visible de produit P <sub>1</sub> .
<b>Figure 5</b>	Spectre RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit P <sub>1</sub> .
<b>Figure 6</b>	Spectre RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit P <sub>1</sub> .
<b>Figure 7</b>	La co -chromatographie des sucres libérés des composées p <sub>1</sub> , p <sub>2</sub> .
<b>Figure 8</b>	Série spectrale UV –Visible de produit P <sub>2</sub> .
<b>Figure 9</b>	Spectre RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit P <sub>2</sub> .
<b>Figure 10</b>	Spectre RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit P <sub>2</sub> .
<i>N°</i>	<i>Titre</i>
<b>Chapitre I : matière et méthodes</b>	
<b>Figure 1</b>	Réduction du DPPH par le phénol.
<b>Figure 2</b>	Schéma simplifié de la méthode de l'antibiogramme.
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
<b>Figure 1</b>	La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.
<b>Figure 2</b>	Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait Acétate d'éthyle.
<b>Figure 3</b>	Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait acétate d'éthyle en présence de standard (quercétine).
<b>Figure 4</b>	Effet de l'extraits acétate d'éthyle sur la culture de <i>streptococcus anterococcus</i> SH, et <i>Pseudomananas aeruginosa</i> SH

## *Liste des tableaux*

### Partie phytochimique :

<i>N°</i>	<i>Titre</i>
<b>Chapitre I : aperçu bibliographique.</b>	
<b>Tableau 1</b>	Classification systématique botanique des Asteraceae.
<b>Tableau 2</b>	Position systématique du genre <i>Evax</i>
<b>Tableau 3</b>	La relation entre R <sub>f</sub> et la structure flavonique.
<b>Tableau 4</b>	Position des bandes I et II en fonction de types de flavonoïdes.
<b>Tableau 5</b>	Principaux déplacements des bandes I et II En présences de divers réactifs.
<b>Tableau 6</b>	Déplacements chimiques et constantes de couplages des protons du noyau A.
<b>Tableau 7</b>	Déplacements chimiques et constantes de couplages des protons du noyau B.
<b>Tableau 8</b>	Déplacements chimiques de protons anomeriques de sucres de flavonols monoglycosiles.
<b>Tableau 9</b>	Déplacements chimiques de protons anomeriques de sucres flavonoïdes di glycosylés.
<b>Chapitre II : Etude phytochimique d'une plante du gerne Evax.</b>	
<b>Tableau 1</b>	Les masses des extraits.
<b>Tableau 2</b>	Résultats du fractionnement du mélange extraits Acétate d'éthyles
<b>Tableau 3</b>	Regroupement final des fractions de la colonne.
<b>Tableau 4</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F <sub>7</sub>
<b>Tableau 5</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du produit <b>p<sub>1</sub></b>
<b>Tableau 6</b>	Données spectroscopiques RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>P<sub>1</sub></b> .
<b>Tableau 7</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du produit <b>p<sub>1</sub></b> , après hydrolyse.
<b>Tableau 8</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du produit <b>p<sub>2</sub></b>
<b>Tableau 9</b>	Données spectroscopiques RMN-H <sup>1</sup> (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>P<sub>2</sub></b>
<b>Tableau 10</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du produit <b>p<sub>2</sub></b> , après hydrolyse.

**Partie biologique :**

<i>N°</i>	<i>Titre</i>
<b>Chapitre I : matière et méthodes</b>	
<b>Tableau 1</b>	Les différentes concentrations des extraits.
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
<b>Tableau 1</b>	la densité optique de l'extrait
<b>Tableau 2</b>	Les pourcentages des poly phénols calculés de la phase acétate.
<b>Tableau 3</b>	les pourcentages d'inhibition de l'extrait AcOEt du DPPH en comparaison avec la quercétine
<b>Tableau 4</b>	Les différentes dilutions avec les concentrations finales.
<b>Tableau 5</b>	les zones d'inhibition des différentes dilutions de l'extrait acétate.

## Sommaire

I. Introduction.....	1
Référence bibliographique.....	2

### Partie phytochimique

#### Chapitre I : aperçu bibliographique

I. Introduction sur les Asteraceae .....	5
I.1.place dans la classification systématique botanique .....	5
I.2. Caractères généraux de la famille des Asteraceae .....	5
I.2.1.Appareil reproductif.....	6
I.3 .Donnes phytochimique et pharmacologiques .....	6
I.3.1.Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae .....	6
III.1. Présentation du genre <i>Evax</i> .....	7
III.1.1. Description botanique .....	7
III. 2. Position systématique du genre <i>Evax</i> .....	7
II. Les flavonoïdes .....	8
II.1. Généralité.....	8
II.2. Définition et structure chimique .....	8
II.3. Classification des flavonoïdes .....	9
II.4. Localisation et Distribution .....	10
II.5. Intérêts biologiques des flavonoïdes et composés phénoliques.....	11
II.5.1.Effet antioxydants .....	11
II.5.2.activité anti microbienne des flavonoïdes.....	12
II.5.3.activité antibactérienne des flavonoïdes .....	12
II.6. Les techniques d'identification structurale .....	13
II.6.1. Facteur de retardement et comportement chromatographique .....	13
II.7. Identification spectrale .....	14
II.7.1. La coloration sous UV .....	14
II.7.2. Spectrophotométrie UV- Visible .....	14
II.7.3. Le spectre UV en présence de réactifs :.....	15
II.7.3. à. L'addition d'AlCl <sub>3</sub> et AlCl <sub>3</sub> + HCl : .....	15
II.7.3.b. L'addition de NaOH et de NaOAc : .....	16
II.7.3. c. L'addition de NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : .....	16
Ortho-di-OH sur B. ....	17



II.8. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :	18
II.9. L'hydrolyse acide des glycosides :	20
Référence bibliographique.....	20

## **chapiter II: Etude phytochimique d'une plante du gerne Evax**

I- Etude phytochimique de la plante: .....	27
I.1. Récolte du matériel végétal :.....	27
I.2. Extraction de la plante : .....	27
I.3 Séparations et purification : .....	29
I.3.1. Test chromatographique : .....	29
I.3.2. Séparation sur colonne :.....	29
II.1.1. Etude de la fraction F <sub>7</sub> .....	29
III. Résultats et discussion :.....	33
III.1. Identification de produit P <sub>1</sub> :.....	33
a. Comportement chromatographique :.....	33
b. Données spectrométrie : .....	33
III.2. Identification de produit P <sub>2</sub> :.....	38
a. Comportement chromatographique :.....	38
b. Données spectrométrie : .....	38

## **Partie biologique**

### **Chapitre I : matière et méthodes**

Introduction :.....	40
I. Dosage des polyphénols :.....	40
I.1. Principe du dosage : .....	40
I.2. Protocole expérimental : .....	40
II. Activité anti radicalaire : .....	41
II.1. Définition :.....	41
II.2. Les radicaux libres :.....	46
II.3. Inhibition du radical stable DPPH· : .....	46
II.4. Méthode :.....	47
a. Préparation de la solution DPPH·: .....	47
b. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml : .....	47
c. Préparation des dilutions de l'extrait :.....	47

III. Activité antibactérienne :.....	48
III.1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :.....	48
a. Principe de la méthode Antibiogramme :.....	49
III.2. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide : .....	49
III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle :.....	50
référence bibliographique.....	46

## **Chapitre II: résultats et discussion**

I. Dosage des poly phénols :.....	47
II. Activité anti radicalaire : .....	48
II.1.Etude de l'extrait Acétate d'éthyle : .....	48
a. Détermination de la valeur $CI_{50}$ :.....	49
III.1. Interprétation des résultats : .....	57
Conclusion.....	53

# *Introduction générale*

# Introduction générale

---

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

En effet, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique.

On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont (ou est) responsable(s) de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine [1].

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, etc....), le travail de phytochimiste concerne essentiellement l'isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé quoique ce dernier a tellement évolué ces dernières années.

La flore algérienne qui fait partie de la flore africaine, estimée à plus 3000 espèces dont 15% endémiques [2] appartenant à des familles variées,

Dans le cadre de ce travail, nous allons valoriser une espèce proliférant dans notre région (Constantine), appartenant à la famille des Asteraceae et au genre *Evax*, et qui n'a jamais fait l'objet d'étude. Nos investigations visent l'étude phytochimique et biologique de l'espèce.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie bibliographique, comporte deux chapitres dont :

Le premier comporte une brève présentation des flavonoïdes suivie d'une description botanique de la famille des Asteraceae et du genre *Evax*, en plus des travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, particulièrement les flavonoïdes. On y reporte également les résultats relatifs aux activités biologiques de ce genre.

Le deuxième chapitre est consacré à la description de ces travaux d'étude phytochimique du genre *Evax* comprenant la séparation et l'identification des produits séparés.

Une deuxième partie, biologique, divisée en deux chapitres :

Le premier chapitre a été consacré à la description des méthodes utilisées dans le dosage des polyphénols, les activités antioxydante et anti-radicalaire. Le deuxième, comporte les résultats et discussion.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

[1] Hostettmann, K.O., Potteray and J.L. Wolfender (1998) The potential of higher plants as source of new drugs *chimie*, 2, P10-17.

[2] Quezel et Samter. (1962), Nouvelle flore de l'Algérie.

# *Partie Phytochimique*

*Chapitre I :*  
*Aperçu bibliographique*

## **I. Introduction sur les Asteraceae**

La famille des Asteraceae est une vaste famille du monde végétal, elle est connue par sa richesse en métabolites secondaires bioactif, elle est répartie dans plusieurs régions du monde.

### **I.1.place dans la classification systématique botanique**

La place des Asteraceae dans la classification systématique APG II (Angiosperm Phylogeny Group) est la suivante (Tableau 1)

**Tableau1 : classification systématique botanique des Asteraceae [1 ,2]**

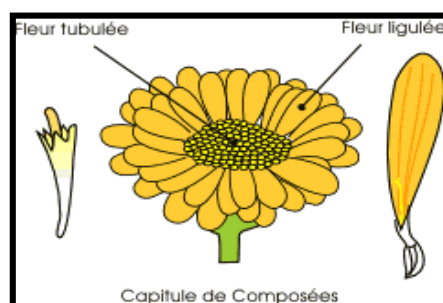
<b>Embranchement</b>	<b>Spernoptytes</b>
Sous_ Embranchement	Gymnospermes, Angiospermes
Sous-classe	Gamopétales
Classe	Dicotyledonae
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

### **I.2. Caractères généraux de la famille des Asteraceae**

La famille des Asteraceae est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 24 000 espèces réparties en 1600 genres [3]. Le sol algérien compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [4].

Les Asteraceae, surtout représentées dans les régions tropicales et subtropicales semi arides et au région tempérées [5], sont principalement des herbes, vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des herbes, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, simples ex stipulées [6].

Selon Gaussen, les Asteraceae sont réparties en fonction de la forme de leurs fleurs en deux types : l'un ayant des fleurs à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées [7].



**Figure1.** Les différents types de la Fleurons des Asteraceae



### I.2.1.Appareil reproductif

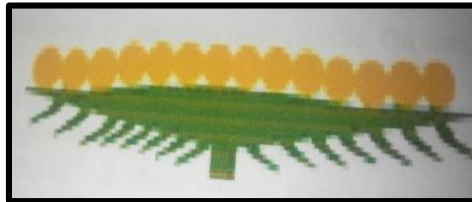
- **L'inflorescence**

L'inflorescence des Asteraceae est : le capitule.

Un capitule comprend un réceptacle plan ou plus moins bombé sur lequel sont insérés de l'extérieur vers l'intérieur, en ordre spirale :

D'abord des bractées stériles vertes (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses) forment un involucre .ensuite des petites bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur. L'ensemble forme une inflorescence composée, d'où l'ancien nom de la famille.

Les capitules sont parfois isolés (pâquerette), mais, plus généralement ils sont à leur tour diversement regroupés : en grappe, en épi, en cyme, ou encore en corymbe chez le groupe des radiées, voir en capture



**Figure 2 .inflorescence en capitule**

Les fleurs sont regroupées en capitules qui peuvent compter centaines de fleurs.

Les capitules sont parfois réduits à quelques fleurs (**Genre Achillea**) voire, exceptionnellement à une seule fleur (**Genre Echinops**) [8].

- **Fruits** ce sont des akènes (fruits secs indéhiscent inséminés) possédant , le plus souvent, un Pappus provenant du développement du calice après la fécondation.

- **Graines** : elles sont ex albuminées.

### I.3 .Donne phytochimique et pharmacologiques

Un grand nombre de composés chimiques ont déjà été isolés à partir des Asteraceae, et ces derniers appartiennent à des groupes phytochimique très variés : glucides, terpènes, alcaloïdes, flavonoïdes, acides phénols et tanins. Certains de ces composés sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés antiseptique, insecticide, anti-inflammatoire, antipaludique. D'autre se sont révélés cytotoxiques ou toxiques.

#### I. 3.1.Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres

espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster.

Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricariachamomilla* L. et *Anthemisnobilis* L.), le pied de chat (*Antenariadiioca*Gartn), le tussilage (*Tussilagofarfara* L.). Certains comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi [9].

Une des propriétés typiques de la famille des Asteraceae est sa richesse en composés naturels divers. On y trouve des terpenoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes [10]. C'est une famille très riche en lactones ses qui terpéniques qui représentent des principes amers typiques de cette famille [9].

### **III.1. Présentation du genre *Evax***

#### **III.1.1. Description botanique**

Capitules hétérogames, multiflores, discoïdes. Bractées de l'involucre sur 1-2 rangs, non carénées ou obscurément carénées; elles le sont nettement dans *Evacidium* et *Filago*, laineuses ou scarieuses. Réceptacle plus ou moins nettement bombé, paléacé au moins sur les bords. Fleurs marginales femelles et sur plusieurs rangs, disposées à l'aisselle de paillettes (non ainsi dans *Evacidium*); celles du disque généralement stériles et peu nombreuses. Anthères caudées ou sagittées. Akènes comprimés, sans aigrette ou à fausse aigrette, à poils courts, papilliformes (les fleurs mâles peuvent, toutefois, avoir des akènes abortifs avec ou sans aigrette). Petite plante pubescente ou laineuse, annuelle. Capitules réunis en glomérules terminaux généralement involuclés par des feuilles florales rayonnantes.

### **III. 2. Position systématique du genre *Evax***

**Tableau 2 :** Position systématique du genre *Evax*

<b>Régne</b>	<b>Plantae</b>
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Evax</i>

En Algérie, il existe six espèces du genre *Evax* : *argentea* Parnel, *crocidion* Parnel, *discolor* (Guss.) DC, *heldreichii* (Parl.) BaU, *mauritanica* Parnel, *pygmaea* (L.) Brot [6] (Figure 3).



Figure 3. Quelques espèces de genre *Evax* [6, 11].

## II. Les flavonoïdes

### II.1. Généralité

Le nom flavonoïde proviendrait du nom latin flavus signifiant "jaune" [12, 13], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [14].

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines [15].

Les flavonoïdes ont constitué un intérêt global croissant pendant la dernière décennie et, en raison de cette croissance dans la recherche, le nombre de flavonoïdes connus a augmenté considérablement. En effet, au début des années 1990, le nombre de structures de flavonoïdes reportées était d'environ 4000 [16], durant cette dernière décennie, ce nombre avoisine les 6500 structures différentes [17].

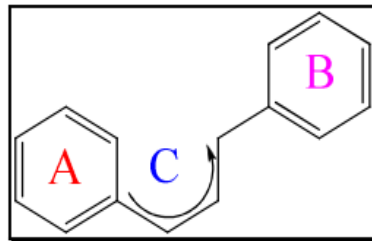
### II.2. Définition et structure chimique

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On

attribue à ces flavonoïdes de différentes propriétés variées. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires [18].

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carbone de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [19].

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [18], en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyle, methoxyle, méthyle, etc.... ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [14, 20] possèdent tous un même squelette (Figure 4).

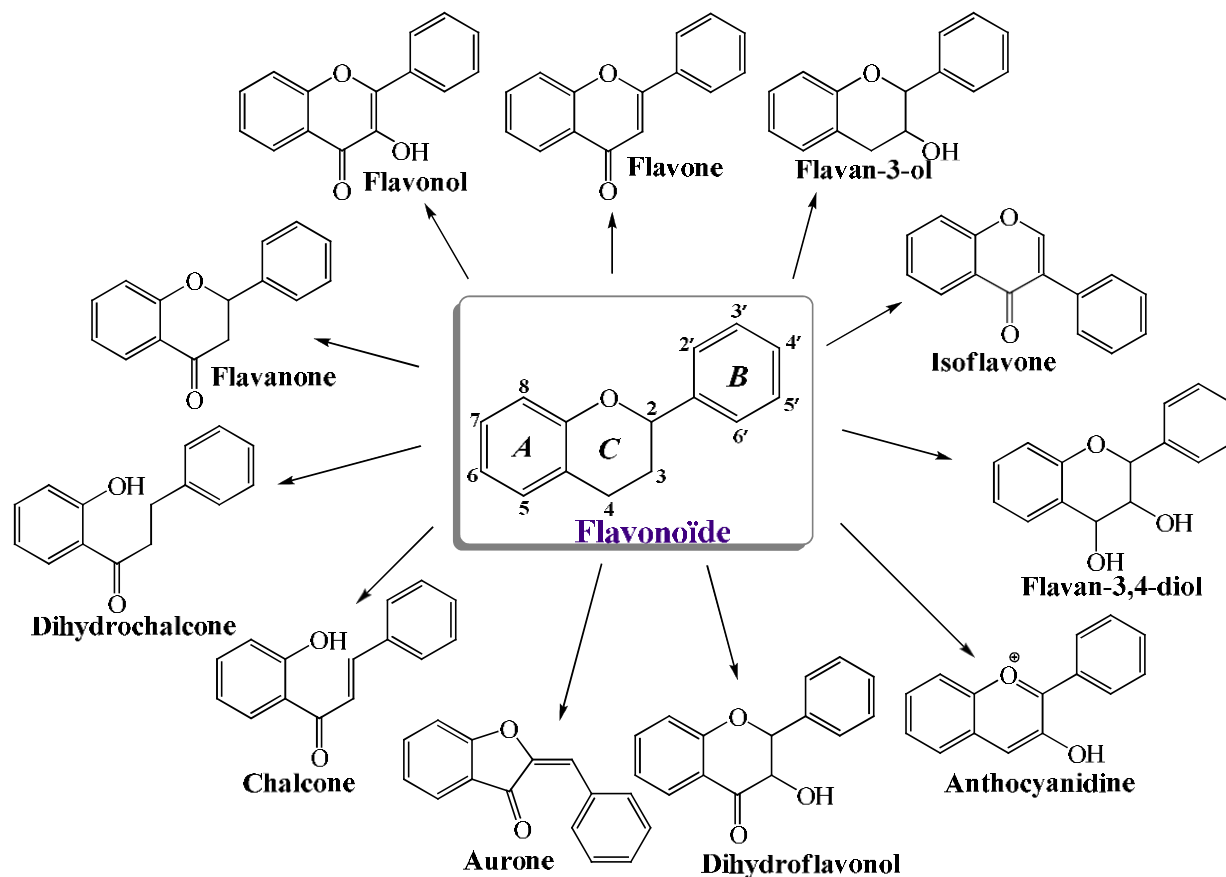


**Figure 4.** Squelette de base des flavonoïdes.

### **II.3. Classification des flavonoïdes**

Les différentes classes sont déterminées par le degré d'oxydation de l'unité de liaison (C3), tandis que, les composés de la même classe sont déterminés par le point d'hydroxylation, ou d'autre substitution, du noyau A ou B. Ils sont généralement solubles dans l'eau [21] et stockés dans des vacuoles ainsi que dans les chloroplastes [22]. Dans la nature, les flavonoïdes sont généralement glycosylés, ces sucres ainsi que les groupes hydroxyles augmentent leur solubilité dans l'eau, d'autres substitutions telles que les méthyles, rendent les flavonoïdes lipophiles [23].

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs classe de molecules sont Les flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonol, isoflavanones ,chalcones aurones ,anthocyanes et tanins(figures5).



**Figure 5.** Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle [24].

#### II.4. Localisation et Distribution

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants [25].

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens, ils peuvent aussi être rencontrés dans certaines boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) [26].

## **II.5. Intérêts biologiques des flavonoïdes et composés phénoliques**

### **II.5.1.Effet antioxydants**

L'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) est à la fois toxique et indispensable à la vie. l'homme ainsi que tout les organismes aérobies le tolèrent car, en contrepartie, ce gaz permet, en tant qu'accepteur final d'électrons au niveau de leur chaîne respiratoire, de stocker de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). l'oxygène permet aussi de faire fonctionner certains systèmes enzymatique. toute fois, cette utilisation de l'oxygène entraîne la formation d'espèces chimiques extrêmement réactives que sont les radicaux libres oxygène.

Ces espèces oxygénés réactives sont (ROS) sont utiles mais peuvent devenir toxiques quand elles sont produites de manière excessive. cette toxicité peut être aggravée, par la présence de façon naturelle dans l'organisme, de certains ions métalliques tels que le fer et le cuivre.

Ces composés peuvent causer des dommages essentiels des membranes cellulaires, des protéines et aussi au niveau des acides nucléiques présents dans la cellule et notamment l'ADN. C'est pour cette raison que notre organisme, lors de son évolution, a développé en parallèle des systèmes de défense afin de le protéger contre cet effet toxique de l'oxygène [20].

Les défenses cellulaires antioxydants peuvent être classées en deux types de défenses ;

Les systèmes de défenses primaires et secondaires. Le système de défense primaire est constitué de systèmes enzymatiques spécifiques tels que la super oxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase ainsi que par une grande variété de petites molécules antioxydants. Le système de défenses secondaire est formé, d'une part par des enzymes spécifiques tels que la super oxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase ainsi que par une grande variété de petites molécules antioxydants. le système de défense secondaire est formé, d'une part par des enzymes lipolytiques et protéolytiques qui vont éviter l'accumulation de composés oxydés résultant d'une attaque radicalaire et autre part, par les systèmes de réparation de l'ADN[27].

Un antioxydant est toutes substances qui, présentent à faible concentration par apport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou évite l'oxydation de ce substrat [28].

L'antioxydant peut agir par de nombreux mécanismes différents qui peuvent être l'élimination directe de l'oxygène, le piégeage des espèces oxygénées ou azotées réactives (ROS et NOS), l'inhibition de la formation de ces ROS et NOS, la chélation des ions métalliques nécessaires à la génération des ROS ou la stimulation des défenses antioxydants Endogènes [29].

Parmi les molécules antioxydants spécialement les <<petites>> molécules antioxydants telles : Les vitamines ( $\alpha$ -tocophérol, acide ascorbique, est.....) mais également sur de nombreux composés naturels extraits de plantes, notamment les caroténoïdes, les composés phénoliques dont font partie les acides phénoliques et les flavonoïdes [30 ,31].

### **II.5.2.activité anti microbienne des flavonoïdes**

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [32].

### **II.5.3.activité antibactérienne des flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactérie : *Staphylococcus aureus* [33] ; *Escherichia coli* [34] ; *Klebsiella pneumoniae* ; et *Pseudomonas aeruginosa*.....ex[35].

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées l'épigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, Toutes les autres ont été fort sensibles à ces flavonoïdes. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécules [36, 37,38].

Aussi dans certains travaux, il a été que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % Etaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plantes ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* [37].

La diffusion radiale souvent demeure utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne in vitro. Même si la mesure par le biais de cette méthode est parfois difficile à cause des zones de diffusion [38].bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur le microorganisme demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites : comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase de *Escherichia coli* [39].

EN effet, selon les travaux de Dadi et ses collaborateurs, la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes :



- Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.

- Elle ploque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase .Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologique nécessaires à son bon fonctionnement

## **II.6. Les techniques d'identification structurale**

L'identification des flavonoïdes se fait généralement (comme avec d'autres structures organiques) par l'utilisation combinée des propriétés chromatographiques des flavonoïdes comme la fluorescence sous la lumière UV-Visible et les valeurs de leurs  $R_f$  dans différents systèmes de solvants et les données de plusieurs techniques spectroscopiques, telles que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés, et qui donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que la spectrométrie de masse (SM) [39,40].

### **II.6.1. Facteur de retardement et comportement chromatographique**

Ce facteur symbolisé par  $R_f$  est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part.

$$R_f = \text{Distance parcourue par le composé} / \text{Distance parcourue par l'éluant.}$$

La valeur du  $R_f$  varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituant sur le squelette flavonique. Le tableau 3 montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$  [39, 40].

**Tableau 3 :** La relation entre  $R_f$  et la structure flavonique

<b>Structure flavonique</b>	<b><math>R_f</math></b>
<b>Augmentation des groupes hydroxyles</b>	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
<b>Méthylation des hydroxyles</b>	$R_f$ augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
<b>Glycosylation</b>	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux



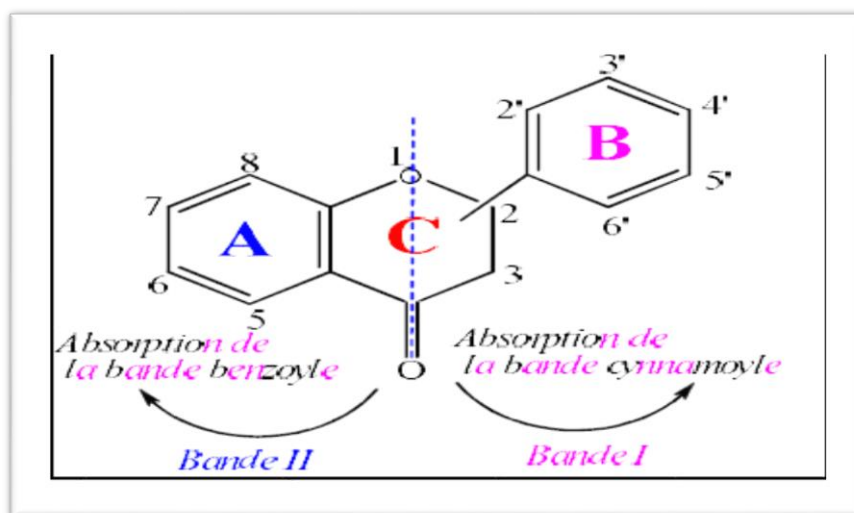
## II.7. Identification spectrale

### II.7.1. La coloration sous UV

L'examen des flavonoïdes sous lumière UV 365 nm est très utilisé pour leur détection. Tous les flavonoïdes apparaissent sous UV sous forme de spots colorés, permettant d'avoir des renseignements pour déterminer leur structure [41, 42].

### II.7.2. Spectrophotométrie UV- Visible

C'est la méthode la plus importante pour l'identification partielle des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales (Figure 6) [43].



**Figure 6:** Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.

✓ **La bande I :** Ayant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison C2-C3 et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

✓ **La bande II :** présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [44].

En présence de divers réactifs : NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc et H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et par des réactions d'hydrolyse et de complexation, les valeurs des déplacements des bandes I et II vont varier ; ce qui nous donne des informations sur La nature des flavonoïdes [45].

Le tableau 4 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes :

**Tableau 4 :** Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes.

Type de flavonoïdes	Bande I $\lambda_{\max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{\max}$ (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Isoflavones	310-330	245-275
Flavanones et dihydroflavanols	300-330	275-295
Chalcones	340-390	230-370 faibles intensités
Aurones	380-430	230-370 faibles intensités
Anthocyanidines et anthocyanines	465-560	270-280

L'addition de divers réactifs au flavonoïde permet de localiser les substituants sur le squelette flavonique où en général la présence d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'ondes). Pour une méthylation ou glycosylation des positions 3, 5 et 4' hydroxylées, un déplacement hypsochrome est noté par la bande I.

### **II.7.3. Le spectre UV en présence de réactifs :**

Les réactifs souvent utilisés sont : NaOH, NaOAc, NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl. Certains d'entre eux forment des complexes tels qu'AlCl<sub>3</sub> et NaOAc.

#### **II.7.3. à. L'addition d'AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub> + HCl :**

L'addition de AlCl<sub>3</sub> à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et le groupement carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et le groupement carbonyle [6] ; Ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I mais l'addition de HCl provoque la disparition des complexes instables et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle).

Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence d'AlCl<sub>3</sub> et bien évidemment un effet bathochrome moins important par rapport au spectre dans le méthanol, pris comme référence.

**II.7.3.b. L'addition de NaOH et de NaOAc :****NaOH :**

L'addition de NaOH indique le nombre et la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement les OH des positions 7, 4' et 3 par effet bathochrome de la bande I.

**NaOAc :**

Ce réactif sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui de la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des positions 3,7 et 4' [46]. Le tableau 4 donne les informations obtenues des spectres en présence de réactifs [44, 46].

**II.7.3. c. L'addition de NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> :**

Le H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence d'hydroxyle ortho sur le cycle B ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) à cause des complexes formés, l'effet qui se manifeste est un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre dans le méthanol [47] .

**• Addition des réactifs (série spectrale UV) :**

**Tableau 5:** Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après addition des réactifs.

Les réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350 352-385 328-357	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol-3OH Flavonol 3-OR
NaOMe (NaOH)	+45 à +65 stable / MeOH diminution d'intensité		OH en 4' OR en 4' et OH en 3
	L'intensité diminue avec le temps (décomposition)		3',4' OH ou Ortho-di-OH sur A ou Ortho-di-OH sur B
	Nouvelle bande/MeOH entre 320 à 335		7-OH
NaOAc		+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8.	7-OH
		Pas de déplacement ou très faible.	7-OR
		Spectre qui se décompose avec le temps.	5, 6, 7-tri-OH ou 5, 7, 8-tri-OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+12 à +36		Ortho di-OH sur B
	+05 à +10		Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
AlCl <sub>3</sub>	Une seule bande entre 420-430.		Ortho-di-OH sur B avec 5-OH
MeOH / (AlCl <sub>3</sub> + HCl)	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6.
	+35 à +55		5-OH et 3-OMe
	+50 à +65		OH en 3 avec ou sans OH en 5
AlCl <sub>3</sub> / (AlCl <sub>3</sub> +HCl)	-20 à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360].		<u>Ortho-di-OH sur B.</u>
	-20 à -25		Ortho-di-OH sur A et ortho-di-OH sur B ou tri-OH sur B.

## II.8. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

C'est une méthode très précise et très efficace, elle est couramment utilisée et permet entre autre, la localisation des protons de la molécule [48].

- La détermination du nombre, de la nature et la position des sucres [49,50].
- L'identification des liaisons C-(et O-) sucres.
- L'identification des substituant acylés et leur sites d'acylation.
- L'identification des substituant oxygénés.

### 1. Protons aromatiques

#### • Protons du noyau A :

Selon les substitutions possibles, les résonances et les multiplicités des protons H-5, H-6 et H-8 sont résumées dans le (tableau6).

**Tableau 6 :** Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.

Protons du noyau A Nature du flavonoïde	(H-5) $\delta$ , ppm <i>J</i> , Hz	(H-6) $\delta$ , ppm <i>J</i> , Hz	(H-8) $\delta$ , ppm <i>J</i> , Hz
5, 7 – OH	–	6.0-6.2 d 2.5	6.3-6.5 d 2.5
5-OH, 7OR (R=Gluc.)	–	6.2-6.4 d 2.5	6.5-6.9 d 2.5
7-OR (R=H, sucre)	8.0 d 9	6.7-7.1 dd (9.0 ; 2.5)	6.7-7.0 d 2.5
5, 6, 7-OR R=H, sucre 5, 7, 8-OR	–	6.3 s	6.3 s

#### • Protons du noyau B :

Les protons de ce noyau apparaissent dans l'intervalle {6.7-8.1 ppm}, le déplacement chimique est basé sur les substituant sur le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C (tableau 7) [51].

**Tableau 7 :** Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.

Protons du noyau B	(H2', H6') $\delta$ , ppm <i>J</i> , Hz	(H3', H5') $\delta$ , ppm <i>J</i> , Hz
Flavone (4'-OR)	7.7-7.9 d 8.5	6.5-7.1 d 8.5
Flavonol (4'-OR)	7.9-8.1 d 8.5	6.5-7.1 d 8.5

#### • Protons du noyau C :

Le proton H3 dans la flavone, résonne sous forme d'un singulet dans l'intervalle {6.20-6.40 ppm} [52], mais dans le cas des flavonols il disparaît.

### 2. Protons aliphatiques :

#### • Protons methoxyle :

Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.4 et 3.9ppm [53].

•Protons du sucre :

Les déplacements chimiques des protons anomériques dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone. La constante de couplage entre le proton anomérique du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone, s'il s'agit d'une position  $\alpha$  ou  $\beta$ .

Pour le sucre glucose, le proton anomérique donne en général un doublet et sa constante de couplage est de l'ordre 7Hz, car il est toujours en position  $\beta$  d'après la biogénèse.

Pour le rhamnose, son proton anomérique donne un doublet aussi mais sa constante de couplage est de  $J \approx 2.5$  Hz (position  $\alpha$ ). On peut aussi reconnaître le sucre rhamnose par le signal du groupement méthyle sous forme de doublet entre 0.8-1.2 ppm et avec une constante de couplage de  $J \approx 6$  Hz.

Les tableaux 8 et 9 représentent les déplacements chimiques du proton anomérique de quelques flavonoïdes mono et di-glycosyles.

**Tableau 8 :** Déplacements chimiques de protons anomériques de sucres de flavonols mono glycosyles.

Flavonoïdes	$\delta H1''$ [ppm]
7-O- $\beta$ -D-glucosyl flavonol	4.8 - 5.2
3-O- $\beta$ -D-glucosyl flavonol	5.7 - 6.0
7-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl flavonol	5.1 - 5.3
3-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl flavonol	5.0 - 5.1

**Tableau 9 :** Déplacements chimiques de proton anomériques de sucres flavonoïdes Di glycosylés [54, 55].

Le sucre initial	$\delta H1''$ [ppm]	Le sucre terminal	$\delta H1'''$ [ppm]
3-O- $\beta$ -D-Glucoside	5.72-5.75	2-O- $\beta$ -D-Glucosyl	4.63-4.65
	5.28-5.46	6-O- $\beta$ -D-Glucosyl	3.96-4.02
	5.40-5.66	2-O- $\alpha$ -L- Rhamnosyl	4.90-5.10
	5.28	6-O- $\alpha$ -L-Rhamnosyl	4.37-4.39
3-O- $\alpha$ -L-Rhamnoside	5.56	2-O- $\beta$ -D-Glucosyl	4.10-4.23
	5.21-5.50	3-O- $\beta$ -D-Glucosyl	4.32-4.48
	5.33-5.44	3-O- $\beta$ -D-Galactosyl	4.25
	5.31	3-O- $\alpha$ -L-Rhamnosyl	4.81

### **II.9. L'hydrolyse acide des glycosides :**

Les flavonoïdes existent sous deux formes qui sont les aglycones et les glycosides, ces derniers sont des aglycones ou un sucre (ou plusieurs) est lié soit par une liaison C-C ou CO à l'aglycone, et pour connaître la nature du sucre avec les O-glycosides, on a recours à l'hydrolyse acide qui permet la rupture de la liaison entre l'aglycone et le sucre et ainsi extraire le sucre et l'identifier par CCM, en présence de plusieurs sucres témoins à noter que les C-glycosides sont résistants à l'hydrolyse acide.

On prend 2 ml du glycoside dans un tube à essai, auquel on rajoute le même volume d'une solution HCl (4N), on fait chauffer dans un bain-marie à 100°C pendant 60 minutes.

Ensuite, on procède à des extractions liquide-liquide avec :

- L'éther di éthylique (3 fois).
- L'acétate d'éthyle (3 fois).
- Le n-butanol (1 seule fois).

Lorsqu'on termine, la phase aqueuse doit être chassée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite.

L'identification du sucre se fait par chromatographie :

Sur plaque de gel de silice aspergée avec  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.2M) puis séchée dans l'étuve à 100°C durant 1 heure, on réalise des piqures correspondant aux sucres témoins et à la phase aqueuse de produits testés. Cette plaque est éluée dans un système : acétone/ eau (9 : 1 v/v).

Après séchage de la plaque, on l'asperge encore par un mélange de :

- 1 g d'acide malonique.
- 3 ml d'acide phosphorique concentré.
- 1 ml d'aniline.
- 100 ml d'éthanol.

On laisse la plaque quelques minutes sur la paillasse, puis on la met dans l'étuve à 100°C pendant 5 minutes.

La comparaison des  $R_f$  des différentes taches permet d'identifier le sucre lié à la génine (même  $R_f$  d'un sucre témoin et du sucre de la phase aqueuse du produit testé).

La réalisation d'une plaque CCM des produits testés avant l'hydrolyse et les phases organiques obtenus après hydrolyse est très importante car le changement d' $R_f$  indique que la séparation est faite (dans un système d'éluion polaire le  $R_f$ , après l'hydrolyse acide, augmente).

L'enregistrement du spectre UV dans le MeOH des phases organiques doit permettre l'observation d'un déplacement bathochrome de la bande qui contient le sucre (OR devient OH)



- [1] Markham, K. (1989). *Methods in Plant Biochemistry* .1, Academic Press.
- [2] Harbon, J.B., Marbry T. J., Marbry H. (1975). *The Flavonoides Part 1*. Academic Press.
- [3] APG (Angiosperm Phylogeny Group). (2002). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants ,*APGII. Bot .J.Linn.Soc .*,399-436.
- [4] Br ay, L. (2005). *Phylogénie des angiospermes* .htt :www.Botanique .org.consulté le 21/10/05.
- [5] Bremer, K. (1994). *Asteraceae, Cladistics and Classification*. (Timber Press), 752, Portland, Oregon.
- [6] Quezel, P., Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris.
- [7] Paris, R., Moysse H. (1971). *Précis de matière Médicale*, Tome III. Paris, 397.
- [8] Paulian, P. (1967). *Guide pour l'Etude de quelques plantes Tropicales*, Ed. Gauthier – Villards, Paris.
- [9] Gaussen, H., F, Leroy. (1982). *Précis de botanique (Végétaux supérieurs)*, 2 ème édition, 424- 426.
- [10] Bonnier. (1934). *Flore complète de France, Suisse et Belgique*. édition 10, p.118.
- [11] Ozenda, P. (1977). *Flore du Sahara*, 250-259, Ed CNRS, Paris. France,
- [12] Duval, C., R, Duval. (1978). *Dictionnaire de la Chimie et de ses Applications*. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- [13] Malešev, D., V. Kuntić. (2007). *J. Serb. Chem. Soc.*, 72 (10), 921-939.
- [14] Brunton, J. (2009). *Pharmacognosie-Phytochimie, Plante médicinales*, 4eme éd, revue et augmentée, Paris, Tec and Toc- Editions médicales internationales. p1288.
- [15] Nijveldt , R. J., E. Van Nood, D. E. C. Van Hoorn, P. G. Boelens, K. Van Norren, P. A. M. Van Leeuwen. (2001). *J. Clinical Nutr.*, 74, 418-425.
- [16] Harbone ,J.B. (1994). *The flavonoids advances in research since 1986*. ed. J. B. Harborne, Chapman and Hall
- [17] Harborne, J.B., Baxter H. Eds. (1999). *The handbook of natural flavonoids*. Vol.1, John Wiley and Sons, Chichester.
- [18] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 3eme éd, Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec and Doc Lavoisier, 1120.
- [19] W. J. Erdman, J. D Balentine, L.Arab, G. Beecher, J. T. Dwyer, J. Folts, Harnly, J. P. Hollman, L. C. Keen, G. Mazza, M. Messina, A. Scalbert, J.Vita, G. Williamson, J. Burrowes, (2007). *J. Nutrit.*, 137 (3), 718 -737.

- [20] Emerenciano ,V. P., K. O. Barbosa, M. T. Scotti, M. J. P. Ferriro. ( 2007). J. Braz. Chem.Soc., 18 (5), 891-899.
- [21] Narayana ,K. R., M. S. Reddy, M. R. Chaluvadi, D. R. Krishna. (2001). J. Pharmacol., 33, 2-16.71: 411-423.
- [22] Verpoorter, R. Alfermannv A.W. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism, Ed: Kluwer Academic1- 23.
- [23] Bruneton, J. (1987). Elément de phytochimie et de pharmacology, Ed: Lavoisier. 156-160.
- [24] Crozier, A. Clifford M. N. Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites, Ed: Oxford Blackwell. 1–24, 102-105.
- [25] Harbon, J.B. (1964). Plant polyphenols –XIII :The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisaccharides. Phytochemistry,3(3) : 453-463.
- [26] P. Hutzler, R. Fishbach, W.Heller, T. P. Jungblut, S. Reuber, R. Schmitz, M. Veit, G. Weissenböck, J. P. Schnitzler, 1998. J. exp. Bot., 49(323), 953-965.
- [27] M.E. Verhoeven, A. Bovy, G. Collins, S. Muir, S. Robinson, C.H.R. De Vos, S. Colliver, (2002). J. Exp. Bot., 53(377), 209 -210.
- [28] Ulanowska, K., A . tracz ,G.konopa and G.wegrzym . (2006). differentail antibacterail activity of genistein arising from global inhibition of ADN and protein synthesis in some bacterail strains . Archives of microbiology,184(5) :271-8
- [29] Babayi, H ., I. KOLO and J.Okogum . (2004). the antimicrobail activities of methanolic extract of eucalyptus camaldulensis and terminalai catappa against some bacterail strains > . Archives of microbiology,16 (2) :102-5,.
- [30] Didrak, M. (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (valex ,mimosa bark ,gallnut powers, salvai sp and phlomis sp ». JOURNAL of biol ., 23 :241-8,1999.
- [31] Kuptsova, LP., Bankovskii, AI. *Khim Prir Soedin.* ( 1970). Vol **6**, **128**.
- [32] Feliciano, AS., Barrero, A.F., Miguel del Corral, J.M., Cordaliza, M., Medarde, M. *An Quim Ser, C.* (1985). Vol **81**, **244**.
- [33] Leticia, J., El-Naggar, Beal JL. *J Nat Prod.* (1980). Vol **43**, **649**.
- [34] Nicoletti, M., Serafini, M., Tomassini, L., Bianco, A., Passacantilli, P. *Planta Med.* (1987). Vol **53**, **295**.
- [35] Hutzler, P., R. Fishbach, W.Heller, T. P. Jungblut, S. Reuber, R. Schmitz, M. Veit, G. Weissenböck, J. P. Schnitzler. (1998). J. exp. Bot., 49(323), 953-965.

- [36] Verhoeven, M.E., A. Bovy, G. Collins, S. Muir, S. Robinson, C.H.R. De Vos, S. Colliver. (2002). *J. Exp. Bot.*, 53(377), 209 -210.
- [37] Narayana , K. R.,Reddy M. S. Chaluvadi M. R. Krishna D. R. (2001). Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33, 2-16.
- [38] Stavric , B. Matula T. I. (1992). Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. 274 - 294.
- [39] Das ,H.C., Wang J. H et Lien E. J. (1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship( SSAR ) analysis. 133 – 136. In : JuckerEed. *Progress in Drug Research* .Basel : BirkhauserVerlag.Das H. C. et Weaver G. M. (1972). Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances.*J. Chromatogr.* 67, 105 – 111.
- [40] Bidet, D. Gagnault J. C., Girard P et Trotin F. (1987). Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 - 97.
- [41] Bruneton ,J. (1993). *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales*. Paris,France :Lavoisier. 278-279.
- [42] Aherne, S.A., O'brien, N.M. (2002). chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- [43] Markham, K.R (1982). *Techniques of flavonoids identification*, Academic press, London.
- [44] Mabry, T.J., Thomas M.B., (1970). *The systemati identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254.
- [45] McDonald, S., Prezler, P. D., Antolovich, M., Robards, K. (2001). *Food Chemistry*, 73, 73-84.
- [46] Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S., McAnalley, B. (2003). *GlycoScience & Nutrition*, 4 (6), 7.
- [47] Mabry, T.J., K.R. Markham, M.B. Thomas. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254.
- [48] Berthillier, A. (1972). *La chromatographie et ses applications*, Dunod Paris.
- [49] Harborne, J.B., T. Swain. (1969).*Perspectives in Phytochemistry*, Academic Press, London, New York.
- [50] Valdés , B., S. Talavera, E. (2015). Fernández-Galiano, *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*. Wikipidia.

[51] Loisseur, J. (1973). Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique, Tome1, Editeurs Masson et CIE.

[52] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo, Paris.

[53] Skoog, D.A., West D.M., Holler F.J. (1997). Chimie Analytique. Traduction de la 7ème édition américaine par Buess-Hermann C., Dauchot-Weymeers J., Dumont F., De Boeck Université. 996.

[54] Rhode, R. (1998). Extraction Liquide/Liquide. Cours du Lycée Pradeau la Sède, Tarbes.

[55] Mekkiou Ratiba. Thèse de Doctorat. Université Mentouri-Constantine.

*Chapitre II :*  
*Etude phytochimique d'une*  
*plante du genre Evax*

## **I- Etude phytochimique de la plante:**

### **I.1. Récolte du matériel végétal :**

La plante a été récoltée dans la région de Constantine au mois de Mai 2014. Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (feuilles-tiges) ont été pulvérisées, broyées et pesées (m=950g).

### **I.2. Extraction de la plante :**

La matière végétale a subi une macération dans un mélange hydro alcoolique (EtOH/H<sub>2</sub>O: 7/3, v/v), pendant 24 heures. Le premier extrait récupéré est filtré puis concentré sous pression réduite. La macération est répétée (3x24 heures) avec renouvellement du solvant.

≈ Après concentration à une température n'excédant pas 40°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée.

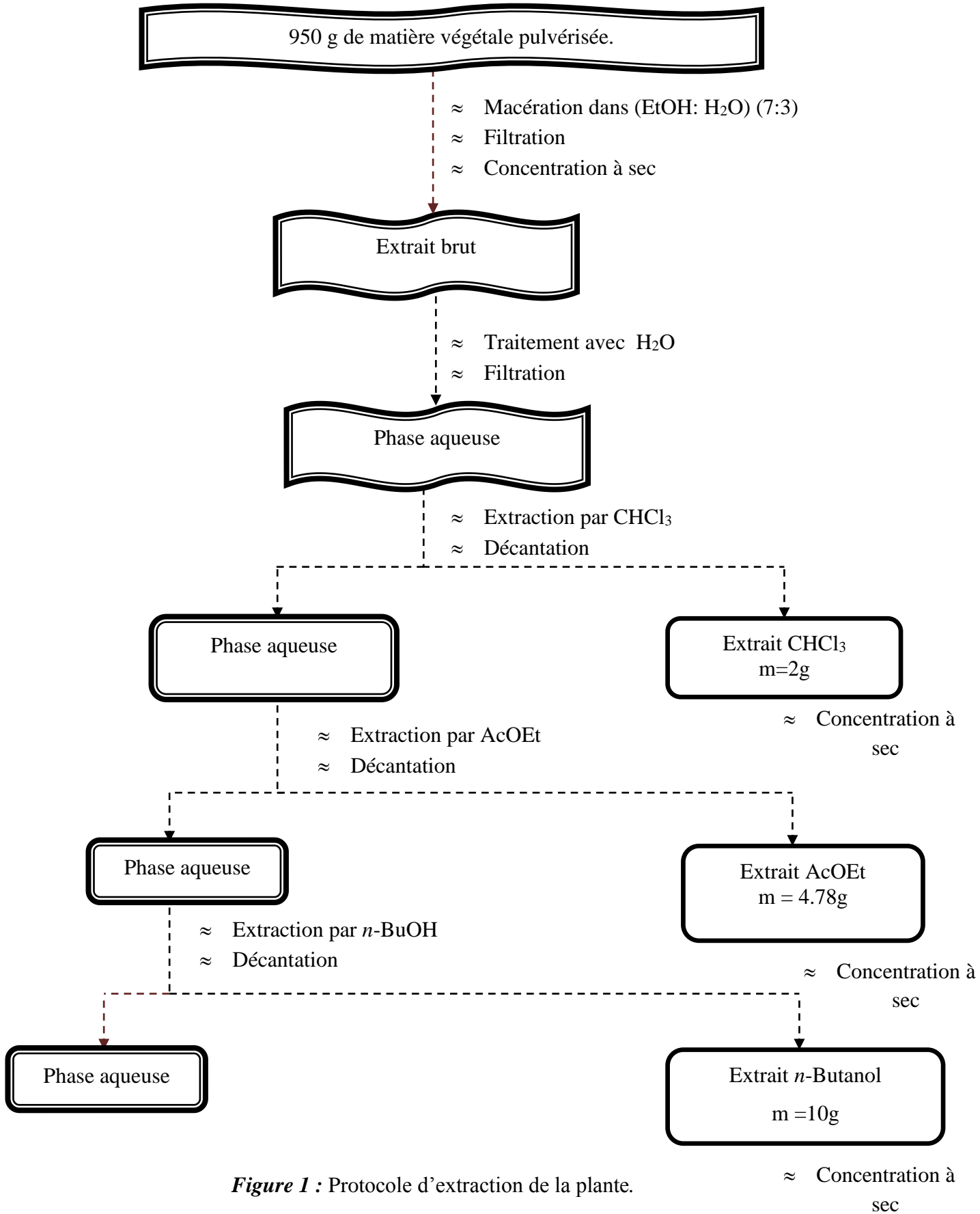
≈ La solution obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, etc...

≈ Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par des extractions liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

≈ Les trois phases organiques récupérées sont évaporées sous pression réduite et pesées les rendements sont donnés dans le (tableau 1).

**Tableau 1 :** Les masses des extraits.

<b>Matériel végétal</b>	<b>Extrait</b>	<b>Masse (g)</b>
<b>950g</b>	<b>Chloroforme</b>	2
	<b>Acétate d'éthyle</b>	4.78
	<b><i>n</i>-butanol</b>	10

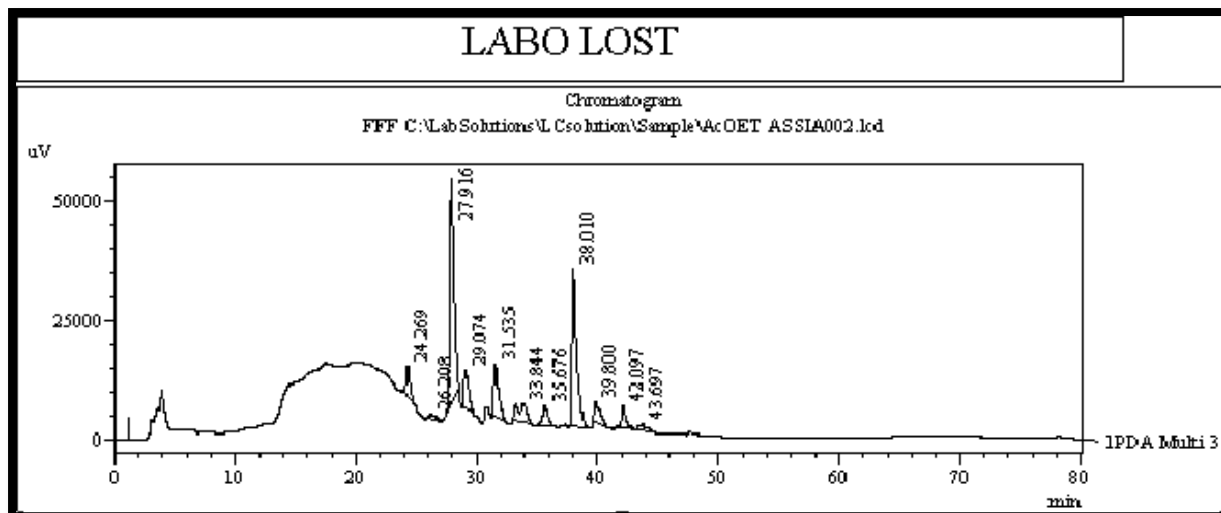


**Figure 1 :** Protocole d'extraction de la plante.

## I.3 Séparations et purification :

### I.3.1. Test chromatographique :

Le profil HPLC de la phase acétate d'éthyle montre que l'extrait est riche en **flavonoïdes**. (Voire annexe).



*Figure 2* : Le profil HPLC de la phase acétate

#### • Conditions :

- ✓ **Colonne** : RESTEK ultra C18, 5µm, 250x46 mm
- ✓ **Eluant** : ACN/H<sub>2</sub>O (50:50).
- ✓ **Débit** : 1ml/min.
- ✓ **Température** : 30°C.

### I.3.2. Séparation sur colonne :

**4.78g** de l'extrait **Acétate d'éthyle** sont dissous dans le minimum de méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de polyamide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée en haut de la colonne de polyamide préparée dans le toluène. L'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-méthanol, commençant par le toluène pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive de méthanol.

Des fractions de **150 ml** sont recueillies. La progression de cette colonne est rassemblée dans le (tableau 2)



**Tableau 2:** Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.

Lot de fraction	Toluene %	MeOH %
1-5	100	0
6-16	98	2
17-30	96	4
31-51	92	8
52-80	88	12
81-112	85	15
113-144	80	20
145-180	75	25
181-200	70	30
201-220	50	50
221-230	0	100

Les fractions sont analysées par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice avec différents systèmes d'élutions.

Les plaques CCM sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées avec l'acide sulfurique.

Selon les résultats donnés par les plaques chromatographiques sur gel de silice, éluées par différents systèmes, nous avons pu regrouper les fractions qui ont les mêmes compositions et le tableau 3 résume le regroupement des fractions de la colonne.

**Tableau 3 :** Regroupement final des fractions de la colonne.

Lot	N° de la fraction	Observation
1-10	F <sub>1</sub>	Graisse et cires
11-41	F <sub>2</sub>	Mélange de produits
42-50	F <sub>3</sub>	
120-125	F <sub>4</sub>	Mélange séparable
60-79	F <sub>5</sub>	Mélange séparable
80-90	F <sub>6</sub>	Faible quantité
91-114	F <sub>7</sub>	Mélange séparable
115-139	F <sub>8</sub>	Mélange séparable
140-162	F <sub>9</sub>	Faible quantité
163-175	F <sub>10</sub>	Produit majoritaire
176-190	F <sub>11</sub>	Mélange complexe
191-217	F <sub>12</sub>	
218-230	F <sub>13</sub>	

Parmi les fractions obtenues, on a étudié celles qui sont simples et séparables et celles qui ont une quantité importante


Après l'examen des plaques CCM de gel de silice sous lumière UV à 254 nm et 365 nm, on a choisi l'étude de deux fractions : F<sub>7</sub>, F<sub>10</sub>.

### II.1.1. Etude de la fraction F<sub>7</sub>

La fraction F<sub>7</sub> (164 mg) a subi une deuxième séparation sur colonne isocratique de gel de silice en utilisant le système : AcOEt/MeOH /H<sub>2</sub>O (20 :0,25 :0.25) v/v. comme éluant.

Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions, sont présentés dans le (tableau 4).

**Tableau 4** : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F<sub>7</sub>

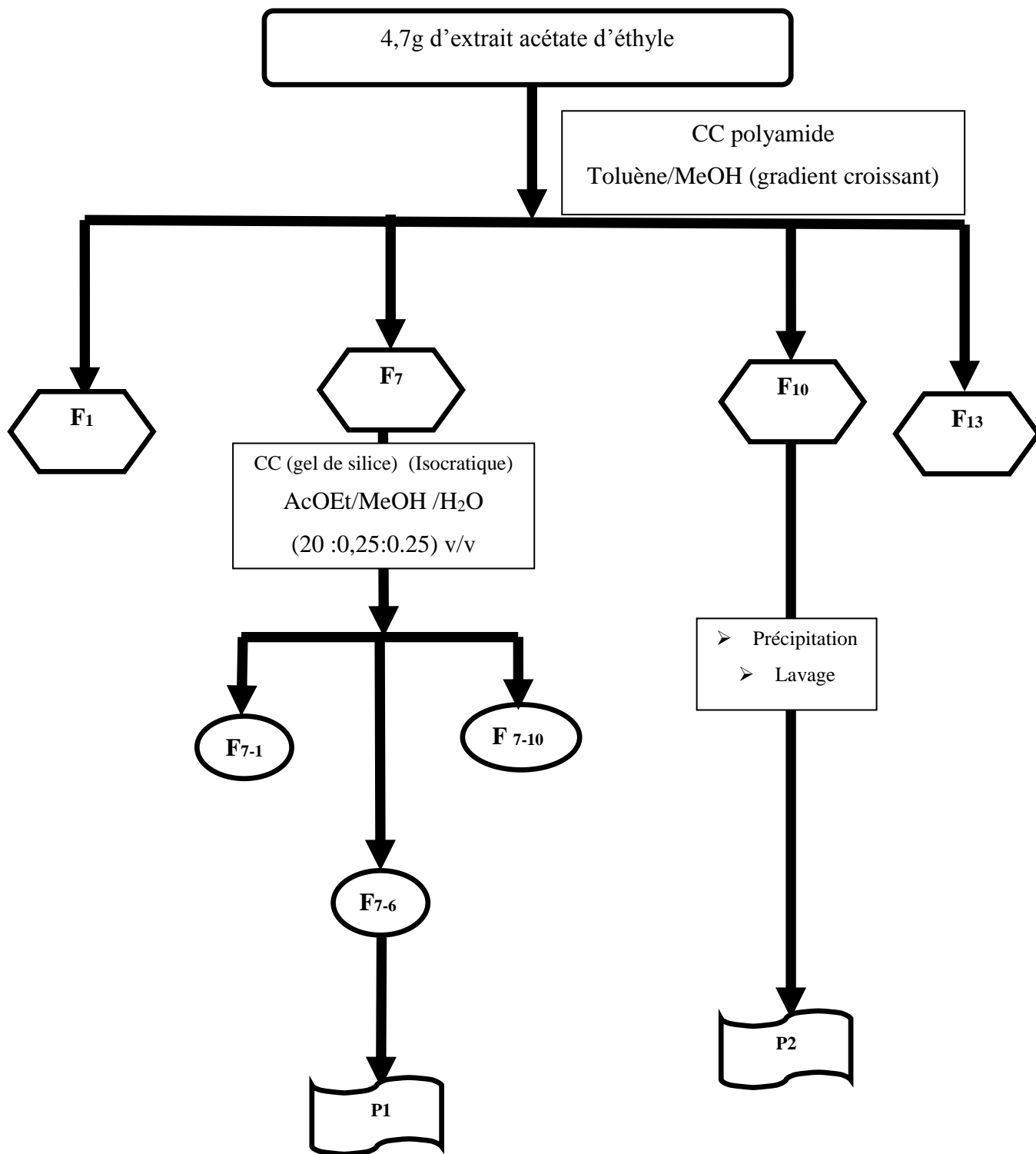
<b>AcOEt :MeOH :H<sub>2</sub>O (20 :0,25 :0.25) v/v</b>	1-16	F <sub>7-1</sub>	Produits non flavoniques	
	17-27	F <sub>7-2</sub>	Mélange de produit	
	28-36	F <sub>7-3</sub>	Mélange de produit	
	37-42	F <sub>7-4</sub>	Mélange du produit et début d'apparition du produit P1	
	43-48	F <sub>7-5</sub>	Produit P1 de petite quantité	
	49-53	F <sub>7-6</sub>	Produit P1, mono-tâche	
	54-60	F <sub>7-7</sub>	Quantité insuffisante	
	61-67	F <sub>7-8</sub>	Mélange complexe	
	68-73	F <sub>7-9</sub>		
	74-80	F <sub>7-10</sub>		

#### **a. Traitement de la sous fraction f<sub>7-6</sub> :**

La sous fractions **f<sub>7-6</sub>**, montre une mono-tâche sur la plaque CCM de coloration **violette**, sous la lumière UV 356 nm.

#### **▪ Traitement de la fraction F<sub>10</sub>:**

Dans la fraction **F<sub>10</sub>**, nous avons observé la formation de cristaux fins de couleur jaune que nous avons lavé et séché pour obtenir **42 mg** de produit à l'état pur.



**Figure 3:** Organigramme de Séparations chromatographiques effectuées sur l'extrait Acétate de la plante.

### III. Résultats et discussion :

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectrales, particulièrement la RMN- $^1\text{H}$  et UV-Visible, sans négliger les autres caractéristiques physicochimiques (hydrolyse acide,  $R_f$  et la fluorescence sous lumière de Wood).

#### III.1. Identification de produit P<sub>1</sub> :

##### a. Comportement chromatographique :

Système	SI
$R_f$	<b>0.34</b>
Fluorescence sous lumière de Wood	<b>Violette</b>

SI : (AcOEt : MeOH : H<sub>2</sub>O) (20 :0.25 :0.25) v/v

##### b. Données spectrométrie :

##### **b.1. Données spectrométrie UV-Visible:**

Le produit P<sub>1</sub> a été analysé en spectrophotométrie UV-Visible en présence d'une série de réactifs permettent de tirer les observations suivants (Tableau 5) :

**Tableau 5:** Données de la série spectrale UV-Visible du produit P<sub>1</sub>.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Autres bandes $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	355	-	254	Flavonol(3-OR)
NaOH	413	330	271	4'-OH
NaOAc	396	-	274	7-OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	365	-	269	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
AlCl <sub>3</sub>	403	-	268	Pas de ortho di-OH sur le cycle B 5-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl	400	-	269	

##### **Interprétation :**

- Le comportement chromatographique dans les différents systèmes indique que le composé P<sub>1</sub> est un flavonoïde monoglycosyle.

- Les données du spectre UV du produit effectué dans le méthanol (Figure 5, Tableau 5), et de la fluorescence violette de ce composé sous la lumière de Wood et la valeur de la bande I ( $\lambda_{max}$ = **355**) nm indiquent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (3-OR).

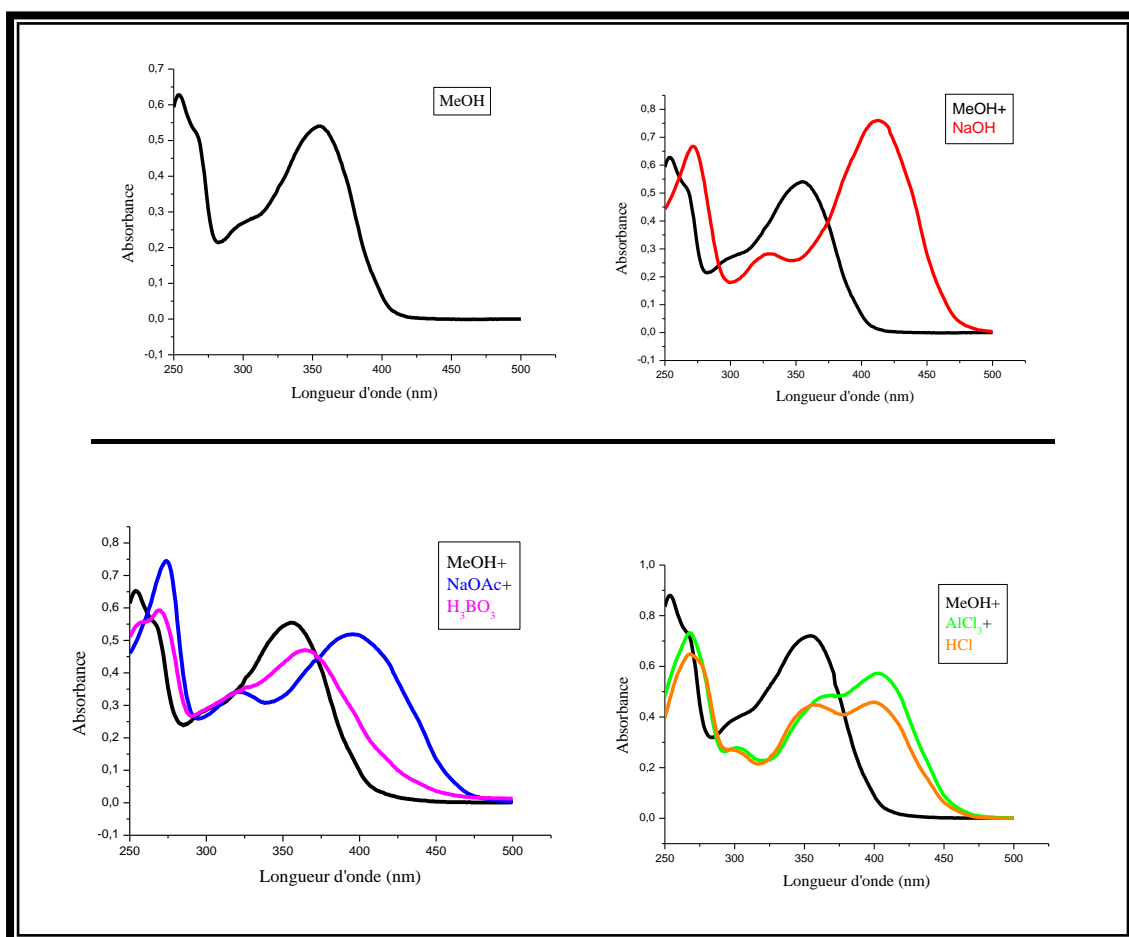
- L'apparition d'un épaulement au niveau de la bande II indique que le cycle B est bisubstitué.

• L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda=+58$  nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', la présence d'une nouvelle bande à **330 nm** montre la présence d'un OH en 7.

• La présence d'un effet bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda=+17$  nm) après l'addition de NaOAc par rapport au spectre MeOH confirme la présence d'un OH en 7.

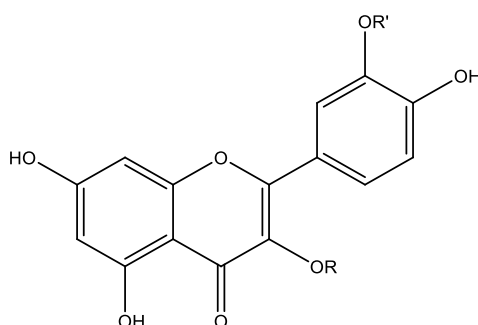
• Le déplacement bathochrome ( $\Delta\lambda=+45$  nm) de la bande I observe dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

• L'absence d'un effet hypsochrome de la bande I après l'addition de HCl au système ( $\text{MeOH}+\text{AlCl}_3$ ) indique l'absence d'un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B. Ceci est confirmé par le faible déplacement de la bande I ( $\Delta\lambda= +3\text{nm}$ ), en comparant le spectre ( $\text{MeOH}+\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ ) avec le spectre enregistré dans le MeOH.



**Figure 4:** Série spectrale UV –Visible de produit **P1**.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante pour le produit **P1** :



## b.2. Données spectroscopiques RMN-H<sup>1</sup>:

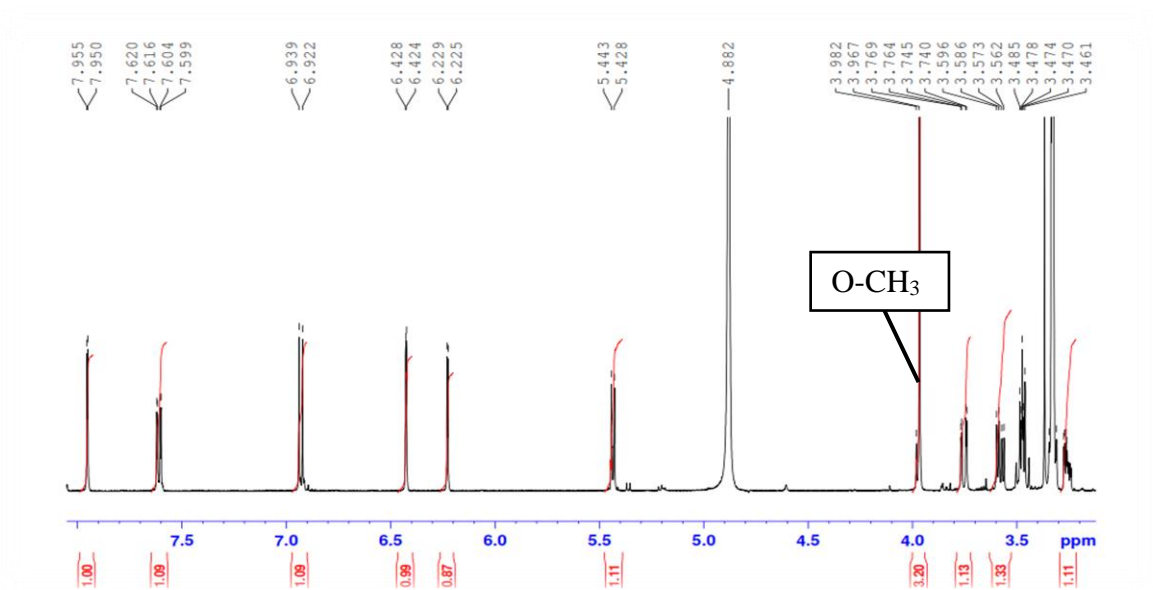
**Tableau 6:** Données spectroscopiques RMN-H<sup>1</sup> (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **P1**.

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
7.95	1H	d	2.0	H <sub>2</sub> '
7.61	2H	dd	8.5 et 2.0	H <sub>6</sub> '
6.93	1H	d	8.5	H <sub>5</sub> '
6.43	1H	d	2.1	H <sub>8</sub>
6.23	1H	d	2.1	H <sub>6</sub>
5.44	1H	d	7.4	H <sub>1</sub> ' (Glu)
3.76	3H	s	-	OCH <sub>3</sub>

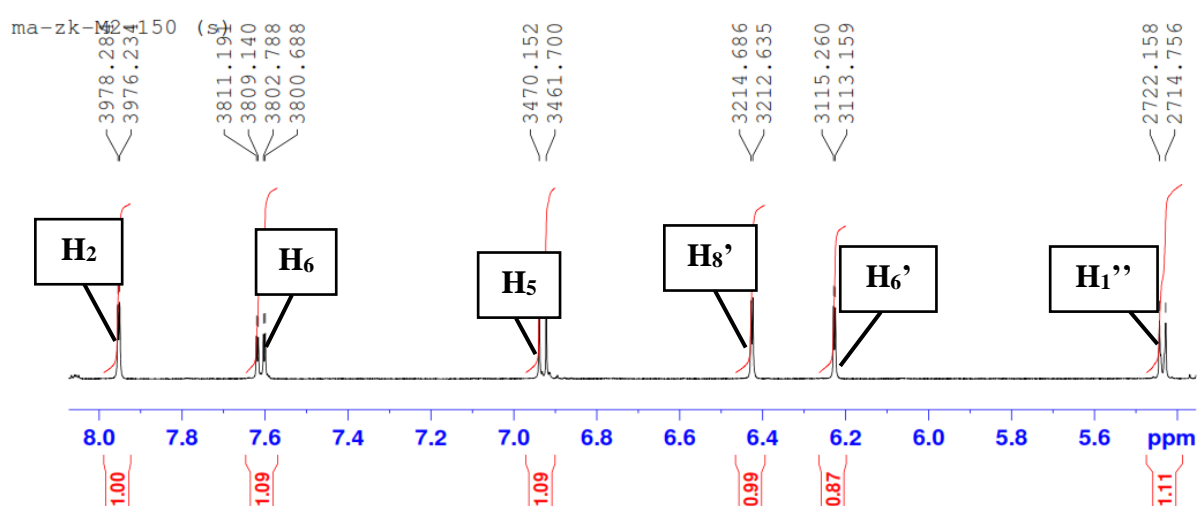
### Interprétation :

Le spectre RMN-H<sup>1</sup> (Figure 5-6, Tableau 6) confirme les informations apportées par la spectroscopie UV-visible, en montrant les signaux caractéristiques d'un flavonol (3-OR) bi substitué sur le cycle B, apparaissant comme suit :

- Un doublet résonant à  $\delta=7.95$  ppm d'intégration 1H ( $J = 2$  Hz) (couplage *métra*), attribuable à H<sub>2</sub>'.
- Un doublet dédoublé résonant à  $\delta = 7.61$  ppm d'intégration 1H ( $J = 8.5$  et  $2.0$  Hz) (couplage *métra* avec 2' et *ortho* avec 5'), attribué à H<sub>6</sub>'.
- Un double à  $\delta = 6.93$  ppm d'intégration 1H ( $J = 8.5$  Hz) (couplage *ortho*), attribuable à H<sub>5</sub>'. L'ensemble de ces trois signaux oriente vers une bisubstitution du noyau B.
- deux doublets apparaissent à  $\delta=6.43$  ppm et à  $\delta=6.23$  ppm d'intégration 1H ( $J = 2.1$  Hz), attribués respectivement à H<sub>8</sub> et H<sub>6</sub>, (couplage *meta*).
- L'apparition d'un doublet à  $\delta=5.44$  ppm ( $J =7.4$  Hz) caractéristique d'un proton anomérique du sucre H<sub>1</sub>'.
- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta = 3.76$  ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH<sub>3</sub>) dans la molécule.
- Dans l'intervalle [3.20-3.90] ppm, se trouvent les autres protons des sucres.



**Figure 5:** Spectre RMN- $H^1$  (500MHz,  $CD_3OD$ ) du produit **P1**.



**Figure 6 :** Spectre RMN- $H^1$  (500MHz,  $CD_3OD$ ) du produit **P1**.

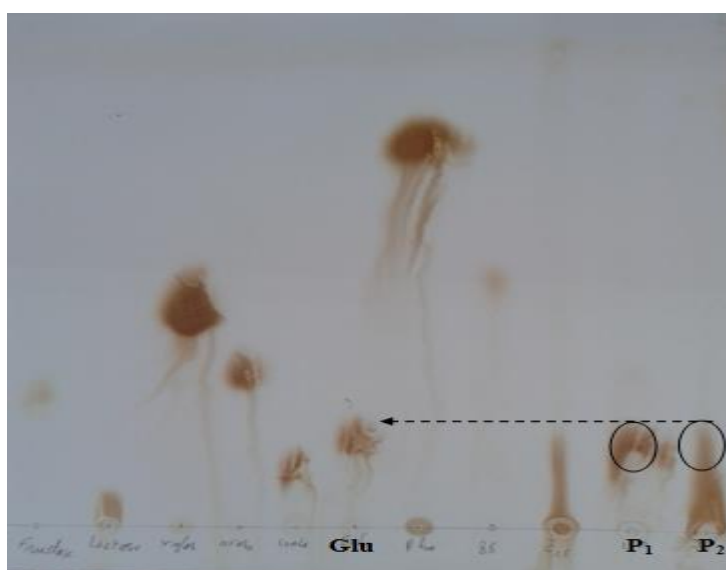
Ces données ne nous permettent pas de suggérer la structure finale du produit **P1**

Pour déterminer la position de méthoxyle et celle de sucres ainsi que la nature exacte du sucre nous avons procédé à l'hydrolyse acide du composé **P1** (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Résultats de la série spectrale UV Visible du produit **P1**, après hydrolyse.

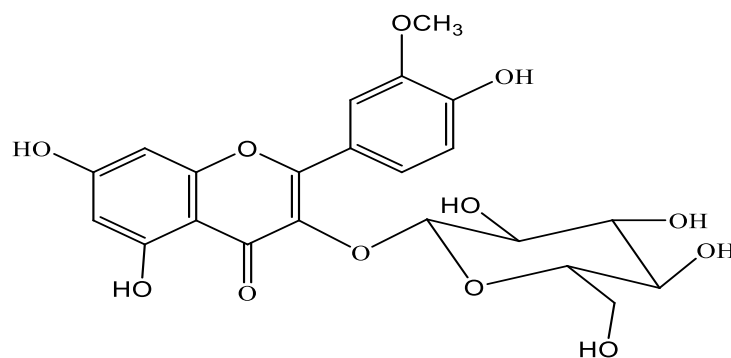
Partie aglycone P <sub>1</sub>		
Réactif	Bande I λ <sub>max</sub> (nm)	Bande II λ <sub>max</sub> (nm)
MeOH	376	256

- L'aglycone obtenue, après l'hydrolyse acide, donne une **fluorescence jaune** sous lampe
- UV indiquant la présence d'un flavonol, ce résultat nous permet de attribuer le groupe méthoxyle à la position 3' et le sucre à la position 3.
- L'hydrolyse acide de ce composé montre la présence d'un glucose identifiés par chromatographie avec des témoins de référence.



**Figure 7.** La Co-chromatographie des sucres libérés des composés **P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>**.

- Ces résultats (UV-Visible, RMN-H<sup>1</sup>, l'hydrolyse acide) nous permettent d'identifier la structure finale du produit **P<sub>1</sub>** :



Ce composé est connu sous le nom : **Isorhamnétine-3-O-β-D-glucoside**.



### III.2. Identification de produit P<sub>2</sub> :

#### a. Comportement chromatographique :

Système	SI
R <sub>f</sub>	0.23
Fluorescence sous lumière de Wood	Jaune

SI : (AcOEt : MeOH : H<sub>2</sub>O) (20 :0.25 :0.25) v/v

#### b. Données spectrométrie :

##### b.1. Données spectrométrie UV-Visible:

Le produit P<sub>2</sub> a été analysé en spectrophotométrie UV-Visible en présence d'une série de réactifs permettant de tirer les observations suivants (Tableau 8) :

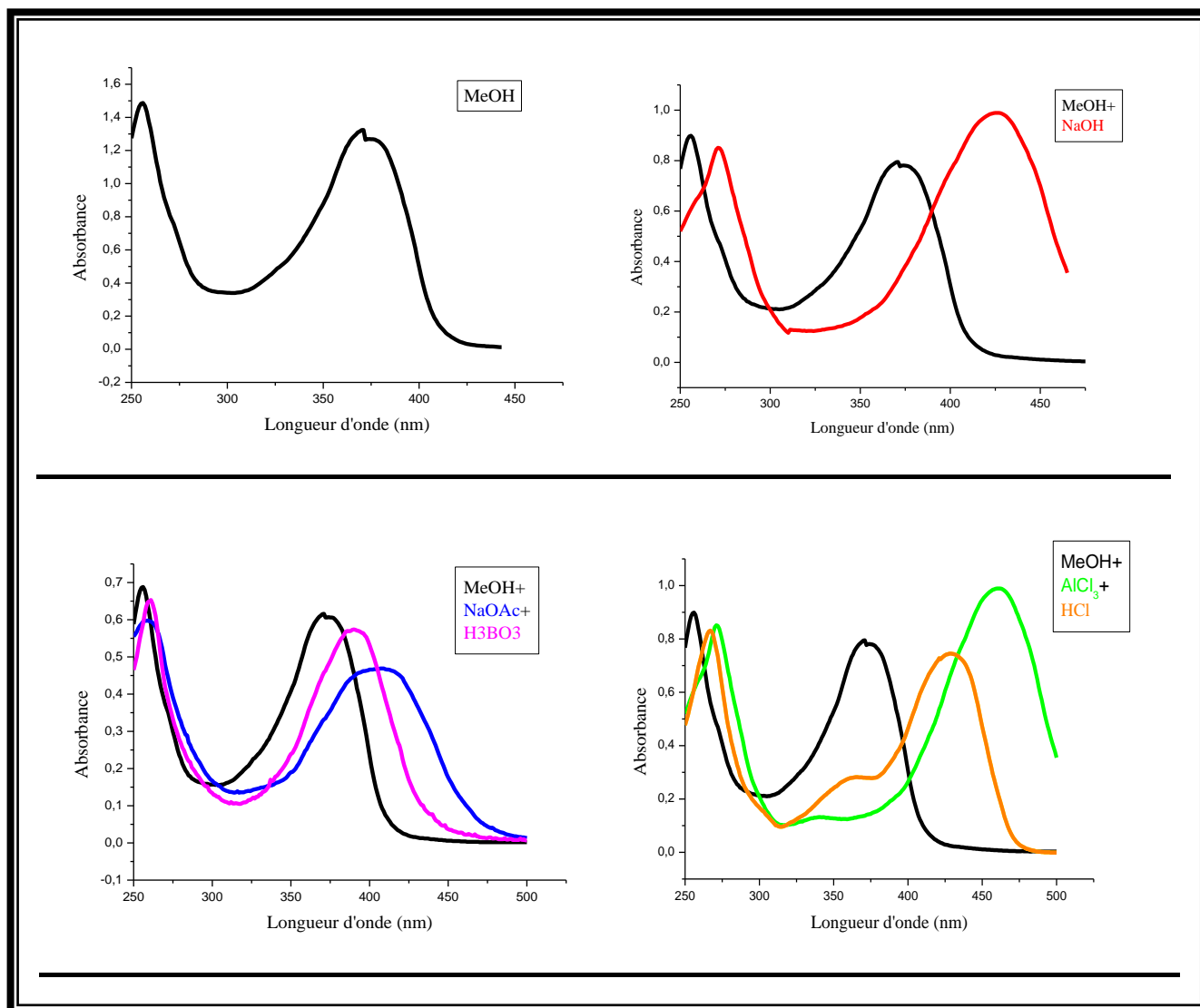
**Tableau 8:** Données de la série spectrale UV-Visible du produit P<sub>2</sub>.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}(nm)$	Autres bandes $\lambda_{max}(nm)$	Bande II $\lambda_{max}(nm)$	Interprétation
MeOH	372	-	256	Flavonol 3-OH
NaOH	425	-	271	4'-OH
NaOAc	406	-	259	7-OR
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	390	-	261	ortho di-OH sur le cycle B
AlCl <sub>3</sub>	461	-	271	ortho di-OH sur le cycle B 5-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl	429	-	267	

#### Interprétation :

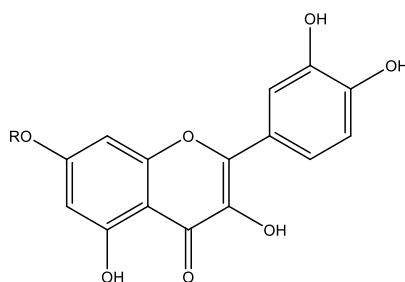
- Le comportement chromatographique indique que le composé est un flavonoïde monoglycosyle.
- La fluorescence jaune sous la lampe de Wood et l'absorption maximale de la bande I à ( $\lambda_{max} = 372nm$ ) du spectre UV du produit enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol 3-OH.
- L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +53 nm$ ) avec augmentation de l'intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4' et l'absence d'une nouvelle bande dans l'intervalle [320-335] nm montre la présence d'un OR en 7.
- L'addition de NaOAc ne provoque pas de déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre MeOH ; ce qui confirme la présence d'un OR en 7.
- Le déplacement bathochrome ( $\Delta\lambda = +57 nm$ ) de la bande I observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié (AlCl<sub>3</sub>+HCl), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

- La présence d'un effet hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = -32$  nm) après l'addition de HCl au système (MeOH+AlCl<sub>3</sub>) indique la présence d'un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +18$  nm), en comparant le spectre (MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH.



**Figure 8:** Série spectrale UV –Visible de produit **P<sub>2</sub>**

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante pour le produit **p<sub>2</sub>** :



## b.2. Données spectroscopiques RMN –H<sup>1</sup> :

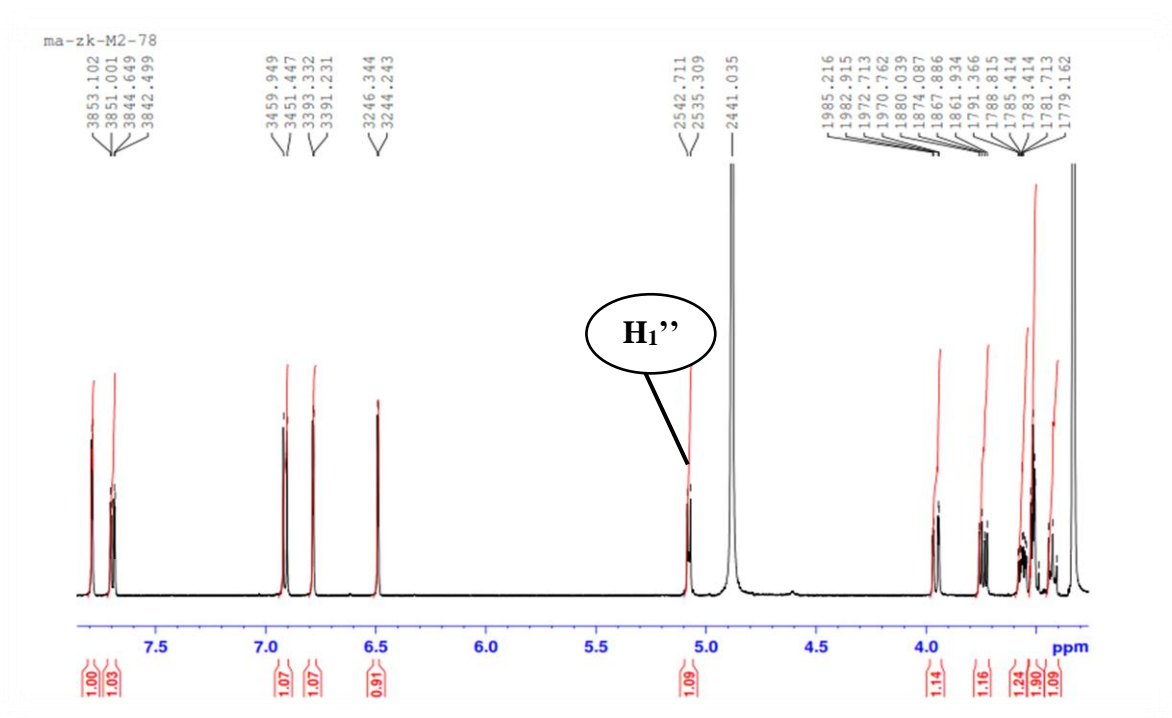
**Tableau 9:**Données spectroscopiques RMN –H<sup>1</sup> (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **P<sub>2</sub>**.

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage <i>J</i> (Hz)	Attribution
7.79	1H	d	2.1	H <sub>2</sub> '
7.69	2H	dd	8.4 et 2.1	H <sub>6</sub> '
6.91	1H	d	8.4	H <sub>5</sub> '
6.78	1H	d	2.1	H <sub>8</sub>
6.49	1H	d	2.1	H <sub>6</sub>
5.08	1H	d	7.4	H <sub>1</sub> '(Glu)

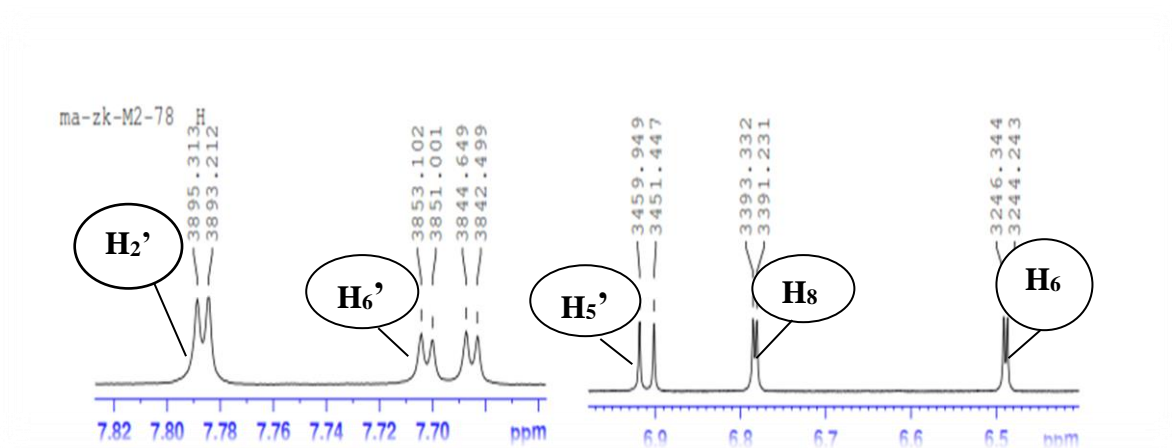
### Interprétation :

Le spectre RMN-H<sup>1</sup> (Figure 9-10, Tableau9) confirme les informations apportées par la spectroscopie UV-visible, en montrant les signaux caractéristiques d'un flavonol (3-OH) substitué sur le cycle A, apparaissant comme suit :

- Un doublet résonant à  $\delta=7.79$  ppm d'intégration 1H ( $J = 2.1$  Hz) (couplage *mé*ta), attribuable à H<sub>2</sub>'.
- Un doublet dédoublé résonant à  $\delta = 7.69$  ppm d'intégration 1H ( $J = 8.4$  et  $2.1$  Hz) (couplage *mé*ta avec 2' et *ortho* avec 5'), attribué à H<sub>6</sub>'.
- Un doublet à  $\delta = 6.91$  ppm d'intégration 1H ( $J = 8.4$  Hz) (couplage *ortho*), attribuable à H<sub>5</sub>'.
- deux doublets apparaissent à  $\delta=6.78$ ppm et à  $\delta=6.49$  ppm d'intégration 1H ( $J = 2.1$  Hz), attribués respectivement à H<sub>8</sub> et H<sub>6</sub>.
- L'apparition d'un doublet à  $\delta=5.08$ ppm ( $J =7.4$  Hz) caractéristique d'un proton anomérique du sucre H<sub>1</sub>'.
- Dans l'intervalle [3.40-3.75] ppm, se trouvent les autres protons des sucres.



**Figure 9:** Spectre RMN  $-H^1$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) du produit **P<sub>2</sub>**.



**Figure 10 :** Spectre RMN  $-H^1$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) du produit **P<sub>2</sub>**.

Ces données ne nous permettent pas de suggérer la structure finale du produit **P<sub>2</sub>**.

Pour déterminer la position et la nature exacte du sucre nous avons procédé à l'hydrolyse acide du composé **P<sub>2</sub>** (Tableau 10).

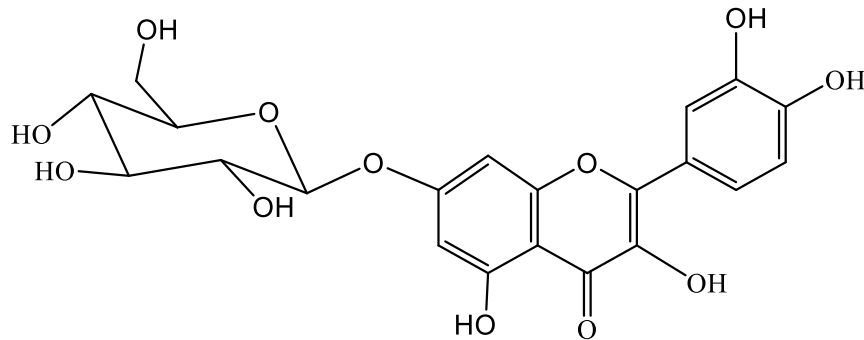
**Tableau 10.** Résultats de la série spectrale UV Visible du produit **P<sub>2</sub>**, après hydrolyse.

Partie aglycone <b>P<sub>2</sub></b>		
Réactif	Bande $\lambda_{max}$ (nm)	Bande $\pi\lambda_{max}$ (nm)
MeOH	371	255
NaOAc	392	274

- Après l'addition de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans MeOH, on observe un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda=+15\text{nm}$ ) indiquant la présence d'un OH libre en position 7 ce résultat confirme la présence d'un sucre à cette position.

- L'hydrolyse acide de ce composé montre la présence d'un glucose identifiés par chromatographie avec des témoins de référence (Figure 7).

- Ces résultats (UV-Visible, RMN  $^1\text{H}$ , l'hydrolyse acide) nous permettent d'identifier la structure finale du produit **P<sub>2</sub>** :



Ce composé est connu sous le nom : **Quercétine-7-O- $\beta$ -D-glucoside**.

# *Partie biologique*

*Chapitre I :*  
*Matière et méthodes*

## **Introduction :**

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques [1].

Pour cette raison la présente étude est consacrée à l'évaluation des propriétés antioxydante et antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle à partir d'une plante de genre *Evax*. Le potentiel antioxydant des échantillons était évalué en utilisant la technique d'inhibition du radical libre DPPH et l'activité bactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé [2].

## **I. Dosage des polyphénols :**

### **I.1. principe du dosage :**

Les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait, fraction et sous-fraction sont déterminées selon la méthode de Folin-Ciocalteu [3].

Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phospho tungstique et d'acide phospho molybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption 765 nm.

Pour cela, la détermination se fait spectrophotométriquement à cette longueur d'onde.

### **I.2. Protocole expérimental :**

- Une prise de 125 $\mu$ L de l'extrait dilué (selon le solvant et l'organe) est mélangée avec 500 $\mu$ L d'eau distillée et 125 $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu.
- Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3min, une prise de 1250 $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% est additionnée.
- Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3mL.
- Après un repos de 90 min à l'obscurité, la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 765nm.
- La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 50,100, 200, 300, 400, 500 mg.mL<sup>-1</sup>. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG. MS).
- La concentration expérimentale de produit est =1 mg /mL.



## **II. Activité anti radicalaire :**

### **II.1. définition :**

L'activité anti radicalaire d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

Un antioxydant est une substance qui, en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat [3].

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposées ; elles incluent le beta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les estrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E.

Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [4].

Pour évaluer l'activité anti-radicalaire de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons effectué deux tests sur ce dernier :

- Inhibition du radical stable DPPH.
- Dosage de polyphénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

### **II.2. Les radicaux libres :**

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés dits célibataires sur l'orbitale externe.

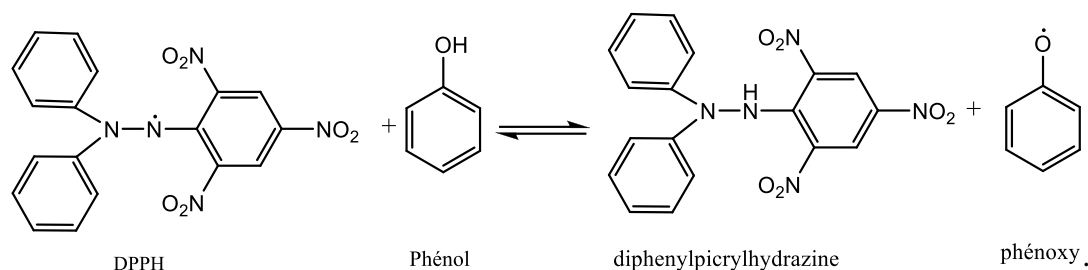
L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène [5].

### **II.3. Inhibition du radical stable DPPH :**

Le composé chimique DPPH ou le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Le principe est de mesurer la capacité des différents extraits à inhiber le radical stable DPPH.

Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeurs des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH (figure 1) au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale qui devient jaune pâle.

L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm [6,7].



**Figure 1** : Réduction du DPPH par le phénol

## **II.4. Méthode :**

### **a. Préparation de la solution DPPH:**

4 mg de DPPH (C<sub>18</sub> H<sub>12</sub> N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ; Mr : 394.33), est solubilisé dans 100 ml de MeOH absolu pour avoir la concentration de 100 µmol/L.

### **b. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml :**

On mélange 0.05g de la phase Acétate d'éthyle, avec 10 mL de MeOH absolu dans un tube à essai.

### **c. Préparation des dilutions de l'extrait :**

L'expérience effectuée sur 5 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol (Tableau 1) :

A partir de chaque solution mère on prépare les dilutions suivantes selon la relation suivante :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

- ❖ C<sub>1</sub> : Concentration de la solution mère (5mg/mL).
- ❖ V<sub>1</sub> : volume de la solution mère (mL).
- ❖ V<sub>2</sub> : volume de MeOH ajouté (mL).
- ❖ C<sub>2</sub> : Concentration finale (mg/mL).

**Tableau 1** : Les différentes concentrations des extraits.

Concentration finale (mg/ml)	V de SM (mL)	V de MeOH (mL)
3	3	2
2	2	3
1	1	4
0.5	0.5	4.5
0.25	0.25	4.75
0.125	0.025	4.975
0.0625	0.0125	4.9875

- On mélange 3mL de la solution méthanolique du DPPH. préparé avec 30µL de l'extrait.
- On laisse à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 minutes.
- On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm.
- Finalement on mesure l'absorbance de chaque concentration par rapport à un blanc constitué uniquement par le méthanol pur (30µL) et le DPPH (3mL).
- On trace la courbe de la cinétique de disparition du DPPH en présence de l'échantillon à tester en fonction du temps pour déterminer le temps de stabilisation de la réaction et pour effectuer la lecture de l'absorbance du produit.
- On convertit les mesures d'absorbance en % DPPH restant par la relation suivante :

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{\text{Blanc} - \text{Extrait} *}{100}$$

- **I %** : Pourcentage d'inhibition.
  - **Extrait** : La densité optique du DPPH en présence de l'extrait à tester.
  - **Blanc** : La densité optique de DPPH dans la solution méthanolique.
- On trace la courbe % DPPH restant en fonction de la quantité de l'échantillon antioxydant (en mg/mL).
  - On termine par la lecture graphique la quantité d'antioxydant nécessaire pour dégrader 50% de DPPH [8].

### III. Activité antibactérienne :

#### III.1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits. Citons quelques méthodes :

- Antibiogramme.
- Méthode de dilution.
- Méthode de micro-atmosphère.

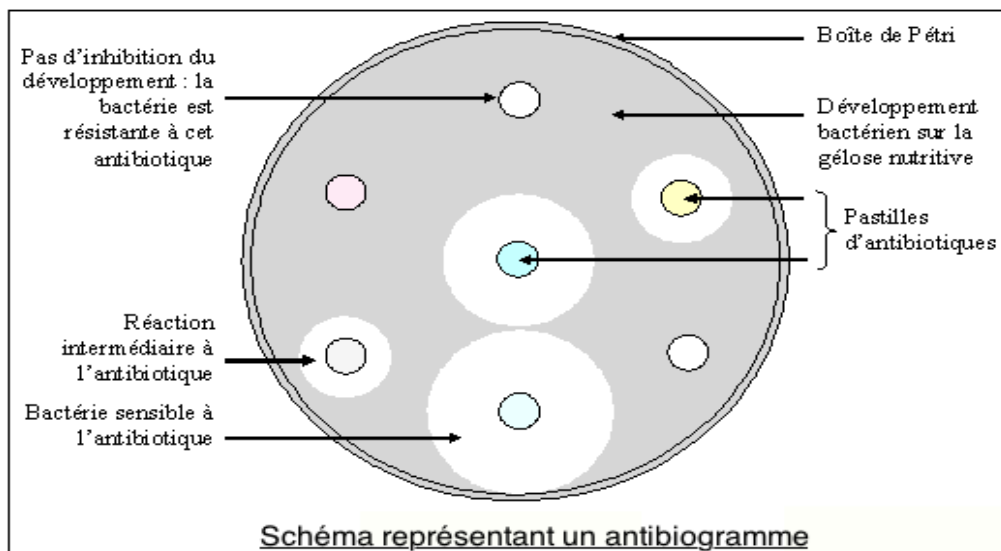
### **a. Principe de la méthode de l'Antibiogramme :**

C'est une vieille méthode pour mesurer le pouvoir antibactérien elle est appelée aussi méthode des disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé, inspire de la méthode de Shroeder et Messing (1949) [10].

Cette méthode consiste à utiliser des disques de papier filtre imprégnés dans les solutions et placés à la surface des gélosesensemencées. Après incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés en mm ; ils correspondent aux zones où les germes avaient été inhibés ou détruits par la diffusion de composés.

La sensibilité d'un germe est nulle quand le diamètre est inférieur ou égal à 8 mm.

Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm, le germe est très sensible [10].



*Figure 2:* Schéma simplifié de la méthode de l'antibiogramme.

### **III.2. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide :**

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique [11].

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'un extrait est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- S'il y a une croissance bactérienne, l'extrait a un effet bactériostatique sur la souche testée.

- Si, au contraire, il y a une absence de croissance bactérienne, l'extrait présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche.

### **III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle :**

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de la plante a été réalisée au niveau du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHU \_ BEN BADES de Constantine).

Le test utilisé dans notre travail est la méthode des disques.

Les bactéries utilisées sont:

- **Des souches de référence:** *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, fournies par l'Institut Pasteur d'Alger. (ATCC = American Type Culture Collection)
- **Des souches hospitalières (SH)** de prélèvements des malades du CHU (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella heilberg*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*)
- **Repiquage des espèces bactériennes :**

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum :**

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 mL de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37 °C.

- **Préparation des disques :**

Des disques de papier Whatman n° 3 de 6 mm de diamètre stériles ( stérilisation à 120 °C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de Acétate sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

- **Préparation des milieux de culture :**

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est 2 mm réparti uniformément dans les boîtes.

Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

- **Ensemencement :**

Des boîtes de pétri stériles préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les extraits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

- **Lecture et analyse :**

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du papier Whatman contenant l'extrait à tester.

La lecture s'effectue après 24 h d'incubation à 37 °C par:

- La mesure du diamètre d'inhibition observé
- Classification des bactéries dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

## *Références bibliographiques*

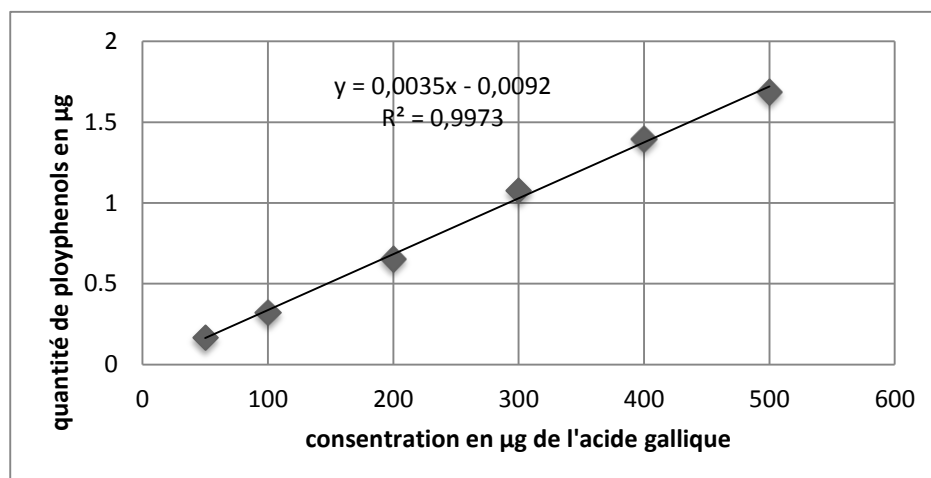
- [1] Bouzid, W., Yahia1, M., Abdeddaim .M., Aberkane ,M.C., Ayachi, A. (2011). *Lebanese Science Journal*, 12(1), p.59.
- [2] Baghiani, A., Belkhiri, F., Boumerfeg, S., Khennouf, S., Arrar, L., Harzallah, D. (2013). *Journal de La Recherche sur La Protection des Plantes*, 53(2), p.128.
- [3] Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. (2000). *Bioresources Technology* 98 (2007), 1120-1123.
- [4] Halliwell, B. (1999). How to characterize a biological antioxydant free radical. *Research Communications*, 9, 1-32.
- [5] Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999). Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland.
- [6] Favier, A. (2003). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 115(2), 108-115.
- [7] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- [8] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft & Technology*, 28: 25-30.
- [9] Svoboda K.P., J.B. Hampson, (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- [10] Duraffourd, C., Dhervicourt, L., Laparaz, J.C. (1990). Examen de laboratoire galénique, *Eléments thérapeutiques synergiques T.1.2ème éd. Masson.paris*, p.10.
- [11] Abdesselam, Z. (2006). Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News*.Ed. Fondation pour le libre choix. 6, p.16.

*Chapitre II :*  
*Résultats et discussion*



## I. Dosage des poly phénols :

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la (figure 1) :



**Figure 1 :** La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La valeur de la DO mesurée de l'échantillon est mentionnée dans le (tableau 1) :

**Tableau 1:** la densité optique de l'extrait

		$\Phi$ acétate
DO (nm)	1 <sup>ere</sup> expérience	1.244
	2 <sup>eme</sup> expérience	1.268

Le pourcentage des composés poly phénoliques indiqué dans le (tableau 2) est calculé selon la relation suivante :

$$Y = 0,0035x - 0,0092$$

**Tableau 2:** Les pourcentages des poly phénols calculés de la phase acétate.

	DO ext	Quantité de poly phénols en (mg/g d'extrait)
$\Phi$ Acétate	1.244	358.05
	1.268	364.91
Thé vert	–	400

❖ Ces résultats indiquent que la richesse de la plante étudiée en polyphénols est importante. L'extrait acétate d'éthyle contient 364.91mg/g de polyphénols, cette quantité est proche aux polyphénols trouvés dans l'extrait de thé vert 400mg/g<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Sun, J., Chen, P., Lin, L.Z., Harnly, J.M. (2011). A non-targeted approach to chemical discrimination between green tea dietary supplements and green tea leaves by HPLC/MS, Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 94: 103-10

## II. Activité anti radicalaire :

Selon les mesures effectuées sur l'extrait acétate de la plante, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition du DPPH. Selon la formule indiquée dans le chapitre précédent.

Les résultats obtenus sont représentés comparativement à la quercétine dans le (tableau3).

**Tableau 3 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH par l'extrait AcOEt.

Concentration d'extrait AcOEt (mg/mL)		% de réductions de DPPH	
Concentration Initiale	Concentration finale	Extrait Acétate D'éthyle	Quercétine
5	0.0495	94.02	/
3	0.0297	92.58	/
2	0.0198	63.39	96.06
1	0.0099	31.02	95.91
0.5	0.00495	19.07	95.81
0.25	0.00247	3.75	94.72
0.125	0.00123	4.81	/
0.0625	0.00061	2.12	/

### II.1. Etude de l'extrait Acétate d'éthyle :

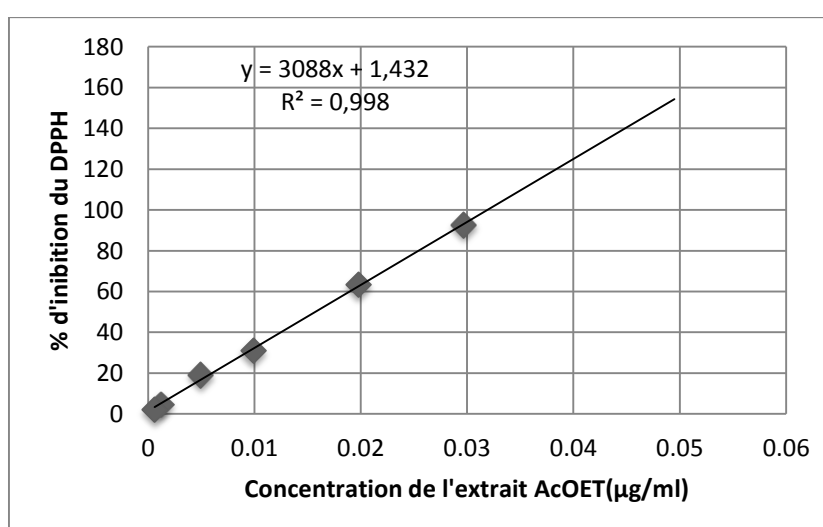
Le tableau 3 montre que l'extrait AcOEt possède un excellent pouvoir inhibiteur du radical DPPH :

La meilleure inhibition (94.02%) est atteinte a une concentration de 500 µg /ml

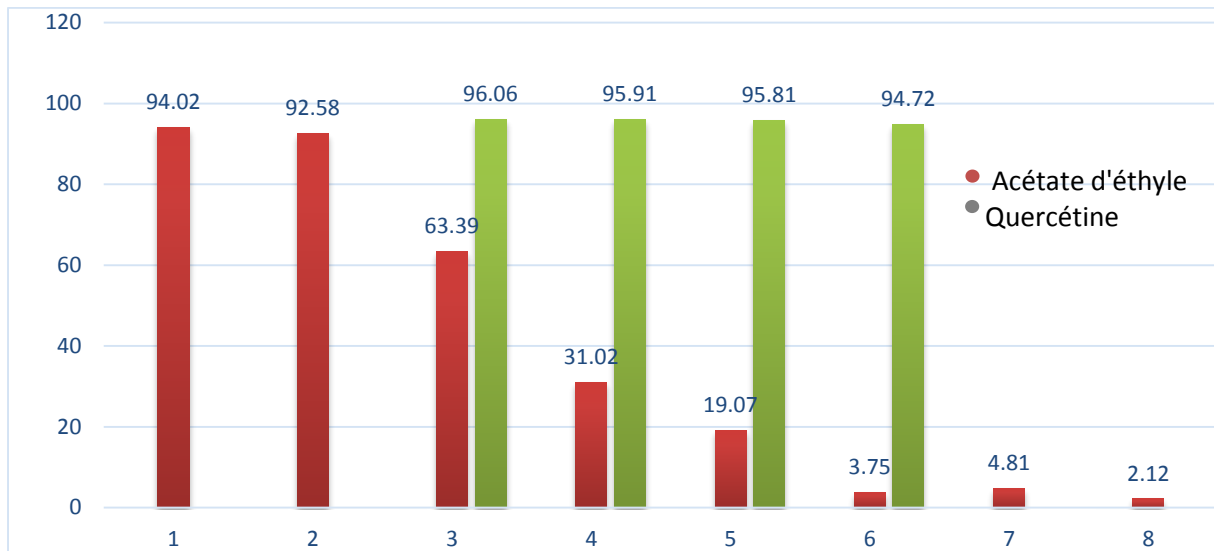
La meilleure inhibition avec la quercitine (96%) et obtenue a une concentration de 200 µg /ml

#### a. Détermination de la valeur CI<sub>50</sub> :

La détermination de la CI<sub>50</sub> se fait à partir du graphe figure 2



**Figure2 :** Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait Acétate d'éthyle.



**Figure 3** : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait Acétate d'éthyle en présence de standard (quercétine).

La concentration correspondante à 50% d'inhibition est calculée selon l'équation du graphe suivante :

$$Y = 3088x + 1.432$$

Pour  $y = 50\%$ , la  $CI_{50}$  sera calculée comme suit :

$$X = (50 - 1.432) / 3088 = 0.01572 \text{ mg/mL}$$

$$CI_{50} = 15.72 \mu\text{g/mL}$$

- Les résultats du test DPPH ont révélé que l'extrait acétate d'éthyle de la plante présente une activité anti radicalaire très importante.
- La valeur de la  $CI_{50}$  porte de celle de la quercétine ( $CI_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$ ) montre que l'extrait AcOEt possède un potentiel anti radicalaire très important.
- Ceci est dû à la grande richesse de l'extrait en polyphénols.
- Ce résultat corrobore la relation polyphénols-activité anti radicalaire DPPH.

### III. Activité antibactérienne :

**Tableau 4:** Les différentes dilutions avec les concentrations finales.

Concentration initiale (µg/mL)	Volume de solution de l'extrait (mL)	Volume d'eau distillée (mL)	Concentration final (µg/mL)
<b>2000</b>	6.4	3.6	(D1)
<b>1280</b>	2	2	(D2)
	1	3	(D3)
	0.5	3.5	(D4)
	0.5	7.5	(D5)
<b>80</b>	2	2	(D6)
	1	3	(D7)

#### III.1. Interprétation des résultats :

- Les zones d'inhibition des différentes dilutions sont résumées dans le (tableau 5)

**Tableau 5 :** Les zones d'inhibitions des différentes dilutions de l'extrait acétate

Souches bactériennes	Zone d'inhibition (mm)					
	Sm	D1	D2	D3	D4	D5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	10	9	8.5	8	7.5
<i>Escherichia coli</i> SH	12	11.5	11	10	9	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	15	14	13	12	11	10
<i>Staphylococcus aureus</i> SH	/	/	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH	14	12	11	10	9	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SH	11	10	9	8	/	/
<i>Salmonella heilberg</i>	12	11	10	9	8	7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	/	/	/	/	/	/
<i>Morganella morganii</i>	13	12.5	12	11.5	11	10

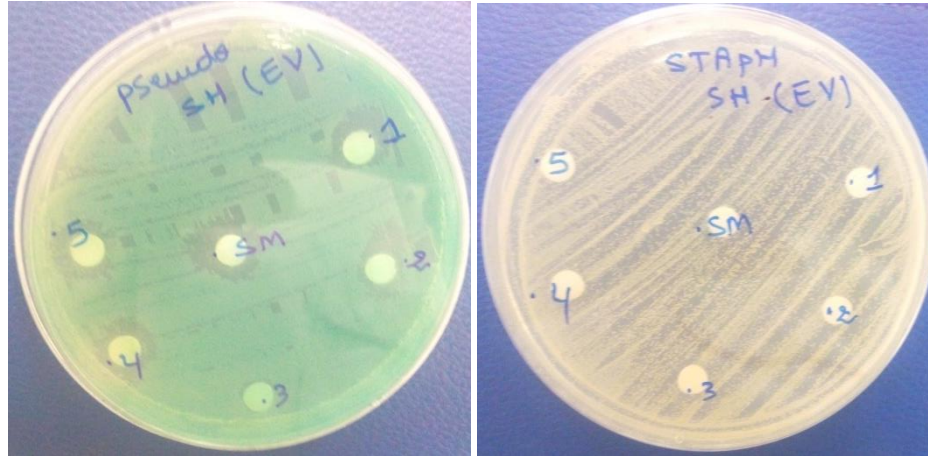
• Les zones d'inhibition de l'extrait Acétate d'éthyle de la plante, indiquent que l'efficacité diminue en fonction des concentrations, plus la concentration est faible moins l'extrait est efficace les zones varient de 7.5 mm à 15 mm (tableau 5).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'éthyle montre une meilleure activité vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* SH et *Morganella morganii* avec des zones d'inhibition respectives de 15, 14 et 13 mm.

On n'observe aucune zone d'inhibition autour des disques pour *Staphylococcus aureus* SH, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC et *Enterobacter aerogenes*.

Les résultats montrent que l'extrait ne possède pas une bonne activité antibactérienne malgré sa grande richesse en polyphénols.

Cela montre qu'il n'y a pas de relation entre l'activité antibactérienne et la richesse en polyphénols bien que certains flavonoïdes possèdent une activité antibactérienne mais cela dépend de leur structure et sur leur mode d'action sur les souches Gram+ ou Gram- à l'inverse de la relation souche -activité anti radicalaire



**Figure 4 :** Effet de L'extraits acétate d'éthyle sur la culture de *Streptococcus anterooccus* SH et *Pseudomonas aeruginosa* SH

# *Conclusion*

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïde à partir d'une plante de la famille Asteraceae et de genre *Evax*, récoltée de la région de Constantine, dans le cadre de la recherche sur les plantes d'origine Algérienne, afin de découvrir l'intérêt biologique de ces dernières et valoriser l'importance de la flore de notre pays.

Nous nous sommes intéressées aux flavonoïdes à cause de profil HPLC de la phase acétate de notre plante qui a montré la richesse de cette dernière aux flavonoïdes.

L'étude phytochimique de cette plante nous a permis de séparer deux flavonoïdes, en utilisant une technique d'extraction et de purification, basée sur la combinaison de méthodes chromatographiques (CC, CCM).

Les deux ont été identifiés, grâce à l'utilisation des méthodes physico-chimiques et spectrales ( $R_f$ , fluorescence, UV-Visible, RMN-  $H^1$ , hydrolyse acide), il s'agit de :

**Isorhamnétine-3-O- $\beta$ -D-glucoside.**

**Quercétine-7-O- $\beta$ -D-glucoside.**

Des tests de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate vis-à-vis de plusieurs souches ont montré que ces dernières ont une sensibilité différente en présence d'activité antibactérienne éventuellement sélective des extraits.

L'extrait acétate a révélé une bonne activité anti radicalaire ( $CI_{50} = 15.72\mu\text{g/mL}$ .) dont le dosage des polyphénols totaux a confirmé une grande richesse ce qui a eu accord avec le résultat de l'activité anti radicalaire.

# Summary

Our works concern the determination of the flavonoids of a plant from the genus *Evax* belonging to the Asteraceae family. For this aim, we have used several methods of extraction and chromatographic separations such as TLC, CCM and HPLC. By the use of physico-chemical and spectral methods (UV-Vis, <sup>1</sup>H NMR and acid hydrolysis), we have isolated and identified two flavonols:

- **Isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside.**
- **Quercetin-7-O-β-D –glucoside.**

The ethyl acetate extract showed the best DPPH radical scavenging. This was confirmed by the total poly phenols titration which revealed the great richness of the ethyl acetate extract, (using Folin-Ciocalteu method).

The ethyl acetate extract exhibited the best antibacterial activity against, *Staphylococcus aureus* ATCC *Pseudomonas aeruginosa* SH and *Morganella morganii*.

**Keywords:** Asteraceae, *Evax*, flavonoids, anti radical activity, antibacterial activity, polyphenols titration.



## المخلص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو فصل و تحديد منتوجات الايض الثانوي الفلافونويدية من الجنس *Evax* الذي ينتمي إلى العائلة Asteraceae و لتحقيق ذلك قمنا باستخدام مختلف طرق الاستخلاص وتقنيات الفصل الكروماتوغرافي (كروماتوغرافيا العمود والطبقة الرقيقة) . عن طريق المعلومات المتحصل عليها بطرق التحليل الفيزيوكيميائي الطيفي (مطيا في الأشعة فوق البنفسجية ومطيا في الرنين النووي المغناطيسي للبروتون أحادي البعد) تمكنا من التعرف على بنى مركبين من النوع الفلافونول:

- **Isorhamnétine-3-O-β-D-glucoside.**
- **Quercétine-7-O-β-D-glucoside.**

أظهر مستخلص خلات الإثيل فعالية مضادة للجذور الحرة جيدة وذلك باستعمال طريقة الـ DPPH ، و هذا ما يعكس غناه بالمركبات الفينولية التي تمت معايرتها بطريقة Ciocolteu-Folin.

كما بين مستخلص خلات الإثيل فقد أظهر فعالية عالية ضد البكتيريا مع كل من السلالات:

*Staphylococcus aureus* ATCC و *Pseudomonas aeruginosa* SH و *Morganella morganii*

**الكلمات المفتاحية:** Asteraceae، *Evax*، فلافونويد، فعالية مضادة للجذور الحرة، فعالية مضادة للبكتيريا، معايرة متعددة الفينول.