



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire..... : **Département**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

Intitulé :

**Etude phytochimique et activités biologique d une espèce du genre *Pulicaria*
(Asteraceae)**

Présenté par : M^{elle} BOUMAZA Samer

Le : 25/06/2025

M^{elle} CHERCHAR Tedj El Malak

Jury d'évaluation :

Président: MOUSSAOULS (Grade- UConstantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : BENMERACHE. A (MCA- UConstantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s): BECHKRI. S (MCB- UConstantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire
2024– 2025**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Avant tout, nous remercions ﷻ Le Tout Puissant et Miséricordieux de nous avoir donné
la force, la persistance et le courage pour suivre nos études.

En second lieu, ce stage de fin d'études pour l'obtention du Master en **Biochimie** a été
réalisé au sein du laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques LOST, attaché à
la Faculté des Sciences exactes de l'Université des frères.

Mentouri de Constantine 1 et dirigé par madame le professeur **Mme Zahia KABOUCHE**,
donc nous exprimons nos sincères remerciements pour nous avoir permis de travailler dans
un cadre agréable et pour toute la sollicitude qu'elle nous a manifestée .

Nous adressons nos plus sincères remerciements aussi et plus grand respect à
notre encadreur **Dr. Abbes BENMERACHE**, qui nous a encadrées et dirigées durant ce
travail avec une grande rigueur scientifique, et aussi nous le remercions pour ses bonnes
explications, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragement, sa gentillesse, nous
sommes très honorées de travailler avec lui.

Enfin, nous remercions aussi les membres de notre jury ; Dr.
MOUSSAOUI Samira et Dr. **BECHKRI Sara**. C'est un réel plaisir pour nous que vous avez
accepté de jury notre travail.

Dédicaces

Je tiens d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir Donné la foi de m'avoir permis m'en arriver là, après je dédie ce travail.

A mon très cher père:

Celui qui dont le nom est gravée dans mon cœur, pour le symbole de l'amour et de la tendresse, mon source de joie et de bonheur, pour celui qui m'a soutenu et encouragé à avancer, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi **cher papa: Ahmed**

A ma très chère mère:

Celle qui m'a donné la vie, celle qui a toujours voulue que je sois la meilleure, à ma raison d'être, La flamme de mon cœur, ma vie, **Mama: Amina.**

Aux personne qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes cotés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études mon frère :

Zaki, et mes sœur: **Soumia,Sara et Samah**

Boumaza Samar

Dédicaces

Je tiens d'abord à remercier ALLAH le tout puissant m'avoir Donné la foi de m'avoir permis
m'en arriver là, après je dédie ce modeste travail:

A mon très cher père:

Celui qui dont le nom est gravée dans mon cœur, pour le symbole de l'amour et de
la tendresse, mon source de joie et de bonheur, pour celui qui m'a soutenu et encouragé à
avancer, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi **cher papa: Adib.**

A ma très chère mère:

Celle qui m'a donné la vie, celle qui a toujours voulue que je sois la meilleure, à ma raison
d'être, La flamme de mon cœur ,ma vie, **Mama: Laila.**

Aux personne qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes cotés, et
qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études mon frère :

Nouefel, et ma sœur: **Amira.**

Cherchar Tadj El Malak

Table de matière

Titres	Pages
Introduction	1
Chapitre I: aperçu bibliographique	
Présentation de la famille des Asteraceae	2
Généralités	2
1.2 Description botanique	3
1.3. Répartition géographique	4
2. Présentation du genre <i>Pulicaria</i>	5
2.1.Généralités	5
2.2. Description botanique du genre <i>Pulicaria</i>	5
2.3 Position systématique du genre <i>Pulicaria</i>	6
2.4 Effet Thérapeutique	6
2.5. Les Activités biologique du genre <i>Pulicaria</i>	7
2.5 Metabolites secondaire de genre <i>Pulicaria</i>	7
2.5.1 Les Flavanoides	7
2.5.1.1 Généralité	7
2.5.1.2 La structure des flavanoides	7
2.5.1.3 les défferents classes des flavanoides	13
2.5.2 Les composés terpéniques :	15
2.5.2.1 Généralité	15
2.5.2.2 Structure des terpenoïdes	15
2.5.3 Les huiles essentielles	17
2.5.3.1 Définition	17
2.5.3.2 Composes chimique des huiles	17
2.5.3.3 localisations de l'huile essentielle	17
2.5.3.4 Domaines d'utilisation des huiles essentielles	18
Chapitre II: Etude phytochimique de la plante	
1. Etude phytochimique de la plante	19
1.1 Matériel végétal	19
1.2.Extraction de la plante	19
1.3 Séparations et purifications	22

I.3.1. Tests chromatographiques	22
I.3.2. Séparation sur colonne	23
2. Résultats et discussion	25
II.1. Identification de produit P1	25
a . Comportement chromatographique	25
b. Données spectroscopiques RMN ¹ H	25
II.2. Identification de produit P3	28
a.Comportement chromatographique	28
b. données spectroscopiques	28
b.1.données spectroscopique UV-Visible	28
b.2. Données spectroscopiques RMN ¹ H	29
Chapitre III: Etude biologique de la plante	
1.Introduction	36
2. Evaluation du potentiel antioxydant	36
2.1 Dosage de total phénolique (FCR)	36
2.1.1. Principe du dosage	36
2.1.2. Protocole expérimental	36
2.1.3 Procédure	36
2.1.4 Gamme d'étalonnage	37
3.1 Dosage de total Flavonoïde, TFC (Total Flavonoïde Content)	37
3.1.1 Principe	37
3.1.2 Préparation des solutions	37
3.1.3 Procédure	38
3.1.4 Pour l'étalon	38
4. Résultats et discussion	39
4.1. dosage des polyphénols et des flavonoïdes	40
5. Activités antioxydants	41
5.1. Effet scavenger du radical DPPH (Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl)	41
5.2. ABTS scavenging activity	43
5.3. Le test FRAP (pouvoir antioxydant réducteur ferrique)	44
6. Discussion des résultats	45
Conclusion générale	47

Liste des figures

Titre	Pages
Figure 1: Quelques espèces des différentes sous-familles des Asteraceae	2
Figures2 : Différents rameaux florifères des espèces Astéracées	3
Figure 3 : Répartition géographique des plantes Astracées	4
Figure 4 : Quelques espèces du genre <i>Pulicaria</i>	5
Figure5 : Structure moléculaire de base des flavanoides des (benzo- α -prône)	8
Figure 6 : Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.	9
Figure 7: structure de base de l'isoprène	16
Figure 8: Extraction de la plante par Soxhlet.	19
Figure 9: Comparaison entre les extraits sur plaque CCM	22
Figure 10: séparation sur Colonne gel de silice	23
Figure 11 : regroupement final des fractions sur plaque CCM	24
Figure 12: Spectre RMN 1H du produit P1 (CD3OD, 500 MHz)	26
Figure 13: Spectre RMN 13C du produit P1 (125MHz/CD3OD)	27
Figure 14: Série spectrale UV-Visible de produit P3	30
Figure 15. Spectre RMN 1H du produit P3 (CD3OD, 500 MHz)	32
Figure 16: Spectre COSY du composé P3	33
Figure 17: Spectre HSQC du composé P3	33
Figure 18: Spectre RMN 13C du composé P3 (CD3OD, 125 MHz).	34
Figure 19: Spectre HMBC du composé P3 (CD3OD, 500MHz)	34
Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	37
Figure 21: Courbe d'étalonnage de la Quercétine	49
Figure 22: quantité en mg des polyphénols et des flavonoïdes dans CHCl ₃ , AcOEt et <i>n</i> - BuOH	40
Figure 23: Structure chimique du radical libre DPPH	42
Figure 24: Formation du radical ABTS ⁺	47
Figure 25 : Microplaque des tests: DPPH, ABTS, FRAP.	47

Liste des tableaux

Titres	Pages
Tableau1 :Classification du genre <i>Pulicaria</i>	6
Tableau 2 : Usagae traductionnelle du quelque espèces <i>Pulicaria</i>	6
Tableau 3: Principaux déplacements des bandes I et II en présence de divers réactifs.	10
Tableau 4 : Déplacement et multiplicité des protons du noyau A	11
Tableau 5: Déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B (mono- substitue)	11
Tableau 6 : Déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B (di-substitue)	12
Tableu 7: Défferents classes des flavanoides	13
Tableau8: Flavonoides présents dans quelques espèces du genre <i>Pulicaria</i>	14
Tableau 9 : Composées terpéniques de quelques espèces du genre <i>Pulicaria</i>	16
Tableau 10: Composés majoritaires des huiles essentielles du genre <i>Pulicaria</i>	18
Tableau11 : Rendement des extraits	20
Tableau 12: Résultats de Fractionnement de l'extrait AcOEt	23
Tableau 13: Regroupement final des fractions de la colonne	24
Tableau 14: données spectroscopie RMN ¹ H (500MHz/CD3OD) du produit P1	27
Tableau 15: données de la série UV-Visible de produit P3	28
Tableau 16: données spectroscopie RMN ¹ H (500MHz/CD3OD) du produit P3	35
Tableau 17: Préparation des solutions de l'acide gallique	37
Tableau 18: Préparation des solutions de la Quercetine	38
Tableau 19: résultats des teneurs en polyphénols des 'extraits (CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH)	40
Tableau 20: préparation des solutions	41
Tableau 21: Activité antioxydante par les tests DPPH, ABTS et FRAP	46

Liste des schémas

Titres	Pages
Schéma 1: Description de différentes étapes d'extraction	21

Introduction

Depuis plusieurs années, l'homme qui vit côte à côte avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie (Marc, T., Gerard, W., and Denis).

Dans les pays en voie de développement, entre 70 et 95% de la population a recours aux plantes médicinales pour les soins primaires par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés, directement ou indirectement, à partir de plantes médicinales, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles (El Ouali, I., Hammouti).

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte plus de 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques, et appartenant à plusieurs familles botaniques (Baker, J. T., Borris)

Le présent travail consiste à effectuer l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante d'une plante médicinale algérienne appartenant au genre *Pulicaria*.

Ces travaux divisés comme suit :

- **Introduction générale :**
- **Le premier chapitre :** est consacré à une recherche bibliographique, comportant une présentation botanique et phytochimique de la famille des Astéracées et du genre *Pulicaria*, les différentes classes de métabolites secondaires les plus connus essentiellement les flavanoides, ainsi que les utilisations thérapeutiques de cette famille et de ce genre.
- **Le deuxième chapitre :** Etude phytochimique portant sur le matériel et méthodes de séparation et la discussion des résultats phytochimiques.
- **Le troisième chapitre :** Etude biologique de notre plante avec l'interprétation et la discussion des résultats biologiques personnels obtenus dans le cadre de cette étude.
- Ce manuscrit se termine par une conclusion générale.

Chapitre I :

Aperçu Bibliographique

1. Présentation de la famille des Asteraceae :

1.1 Généralités :

La famille des Astéracées (Compositae), constitue l'un des groupes végétaux les plus vastes et dominants parmi les angiospermes. souvent appelée famille du tournesol, est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, Ce groupe botanique regroupe des dicotylédones et comprend plus de 1 300 genres ainsi qu'environ 21 000 espèces (**Spichiger et al.,2002**)

En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (**Silvant,2015**).

La plupart des espèces d'Asteraceae sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, mais il existe également des arbustes, des vignes et des arbres. La famille a une distribution étendue, des régions subpolaires aux régions tropicales, dans une grande variété d'habitats. La plupart se produisent dans les climats désertiques chauds et semi-désertiques froids ou chauds, et on les trouve sur tous les continents sauf l'Antarctique. La principale caractéristique commune est l'existence de parfois des centaines de minuscules fleurons individuels qui sont maintenus ensemble par des involucres protecteurs dans les capitules, ou plus techniquement, des capitules (**Funk et al.,2009**)

Le terme « Aster », d'origine grecque, signifie « étoile », en allusion à la forme caractéristique de la fleur. La dénomination scientifique Asteraceae a été proposée par Martynov en 1820, tandis que l'appellation plus ancienne Compositae remonte à Giseke, qui l'a introduite en 1792 (**Quézel,1962 ; Santa,1963**)

Les fleurs et les feuilles de ces plantes sont réputées pour leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antivirales et apaisantes. En conséquence, de nombreuses espèces de cette famille sont employées en médecine traditionnelle (**Rahman et al.,2014**)

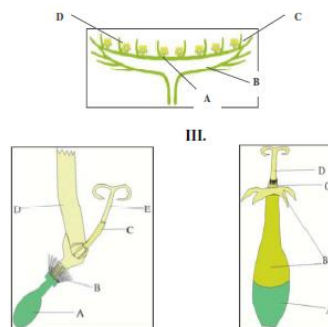


Figure 1: Quelques espèces des différentes sous-familles des Asteraceae (**Panero et al 2008**)

1.2 Description botanique :

Les plantes de cette famille sont généralement caractérisées par :

- **Regroupement des fleurs** : Les fleurs des Astéracées sont réunies en capitules, sans pédoncules, situées à l'extrémité des rameaux ou des tiges, entourées par des bractées florales formant une structure appelée "involucre" (**Barkley et al., 2006**)
- **Structure de la fleur** :
 - Les étamines sont reliées par leurs anthères qui s'ouvrent vers l'intérieur.
 - Sous les stigmates se trouvent des "brosses à pollen".
 - La croissance rapide du style permet de collecter et de récupérer le pollen.
 - Les stigmates s'ouvrent pour exposer leur surface collante au pollen pendant que le nectar est sécrété.
- **Inflorescence et capitule** :
 - Le capitule comporte un réceptacle commun, souvent plat.
 - Il inclut des bractées stériles vertes formant l'involucre.
 - Chaque bractée fertile abrite une petite fleur, créant ainsi une "fleur composée" (**Boullard,1997 ; Usher,1966**)
 -
- **Fruits et dispersion des graines** :
 - Les fruits sont des akènes, souvent surmontés d'une couronne de soies appelée "pappus".
 - Ces soies facilitent la dispersion des graines par le vent [10].



Figures2 : Différents rameaux florifères des espèces Astéracées (**Crete,1965**)

1.3. Répartition géographique :

Les Astéracées connaissent une distribution géographique mondiale. Elles poussent dans presque tous les types d'habitats, à l'exception de l'Antarctique (**Funk et al.,**).

Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale (Guignard,1994).



Figure 3 : Répartition géographique des plantes Astracées (Stevens,2008)

2. Présentation du genre *Pulicaria* :

2.1.Généralités :

Le genre *Pulicaria* est le troisième plus grand genre de la famille des Astéracées. Il contient 100 espèces, principalement des herbes (Touati,2014) originaires de Méditerranée, d'Europe (Espagne, France, etc.), d'Asie (Chine, Turquie, Japon, Corée, etc.) et d'Afrique (Égypte, Algérie, Maroc. . .) (Quézel,1963),

En Algérie, le genre *Pulicaria* est représenté par 16 espèces : *Pulicaria arabica* , *Pulicaria argyrophylla*, *Pulicaria crispan* ,*Pulicaria diffusa* ,*Pulicaria dysenterica* ,*Pulicaria glutinosa* ,*Pulicaria incisa* , *Pulicaria mauritanica* ,*Pulicaria microcephala* ,*Pulicaria odora* ,*Pulicaria petiolaris* ,*Pulicaria raetzeriana*, *Pulicaria scabra*, *Pulicaria undulata*, *Pulicaria vulgaris*, *Pulicaria wightiana*. Parmi elles, quatre espèces se trouvent dans le désert :*P. arabica*, *P. dysenterica*, *P. crispa*, *P. Odora*. (Boumaraf et al.,2016).

2.2.Description botanique du genre *Pulicaria* :

Les caractéristiques des capitules, fleurs et fruits comme suite:

- **Capitule** : hétérogame (comporte des fleurs de sexes différents), multiflores (composé de nombreuses fleurs).

- **Fleurs du rayon (périphériques)** : ligulées. Les ligules peuvent être bien développées et étalées, dressées et dépassant à peine l'involucre (1 à 2 mm parfois), ou parfois absentes. Ce sont des fleurs femelles, disposées sur un seul rang (dans notre région).
- **Fleurs du disque (centrales)** : tubuleuses, hermaphrodites.
- **Involucre** : composé de bractées disposées sur peu de rangs.
- **Bractées** : extérieures courtes ou foliacées, intérieures parfois scarieuses.
- **Réceptacle** : plat, nu, alvéolé à épines.
- **Akènes (fruits secs)** : cylindriques ou comprimés, sans côtes ou avec 4 côtes.
- **Aigrette (pappus) – caractère distinctif du genre *Pulicaria*** : double (contrairement au genre *Inula*).
- **Aigrette extérieure** : courte, en forme de petite coupe (cupuliforme), formée de paillettes ± soudées à la base, libre ou ± soudée avec l'aigrette interne (exemple : genre *Francoeuria*).
- **Aigrette intérieure** : constituée de soies longues et scabres (rugueuses).
- **Couleur des fleurs** : jaune (: **Bonnier,1934**)

*P.Crispa**P.Arabica**P.Dysenterica**P.Odora*

Figure 4 : Quelques espèces du genre *Pulicaria* (L.-L et al.,2010)

2.3 Position systématique du genre *Pulicaria* :

Tableau1 :Classification du genre *Pulicaria* (Botineau et al.,2010)

<i>Règne</i>	<i>Plantea</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Spermatophyte</i>
<i>Sous Embranchement</i>	<i>Angiospermes</i>
<i>Classe</i>	<i>Dicotylidones</i>
<i>Ordre</i>	<i>Asterales</i>
<i>Famille</i>	<i>Asteraceae</i>
<i>Genre</i>	<i>Pulicaria</i>
<i>Espèce</i>	<i>P. arabica</i> <i>P. crispa</i> <i>P. dysenterica</i> <i>P. odora</i>

2.4 Effet Thérapeutique :

Les espèces de *Pulicaria* sont utilisées dans le traitement de plusieurs maladies (**tableau 2**):

Tableau 2 : Usagae traductionnelle du quelque espèces *Pulicaria*.

L'espèce	Effet Thérapeutique
<i>P. odora</i>	Avait des propriétés médicinales contre l'otite moyenne, la dermatite, la pharyngite I, l'ostéosclérose, la salmonellose et la rougeole. Il traite également les maux de dos, les troubles intestinaux et les crampes menstruelles. Il est également considéré comme un remède traditionnel appelé Mssakhen administré aux femmes après l'accouchement (Ezoubeiri et al.,2005).
<i>P. crispa</i>	Est utilisé par les habitants du sud de l'Égypte et de l'Arabie saoudite pour traiter les ecchymoses, les infections cutanées et les troubles gastro intestinaux. (Stavri et al., 2008).
<i>P.arabica</i>	Analgésiques, réduire la fièvre, traiter les maladies inflammatoires, l'hépatite et les affections néphrétiques. (Sassoui et al ., 2022).
<i>P.dysenterica</i>	Efficace et connu pour soigner la dysenterie (Nickavar et al .,2003).

2.5. Les Activités biologique du genre *Pulicaria* :

Selon les recherches précédents sur les activités biologiques des espèces du genre *Pulicaria* , trois espèces de genre connues pour leurs activités biologiques, ces aspèces sont :

- ***Pulicaria crispa*** : les études présentées par (Mothana et al., 2009)qui sont manifesté l'activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti leucémique, activité anti spasmodique , activité anti cancéreuse et anti inflammatoire(Mothana et al .,2008), en raison de ses propriétés de teneur en huile essentielles ainsi pour l'inflammation et comme insectifuge et tisane.
- ***Pulicaria odora*** : cette espèce riche en constituants phénoliques ,en particulier , les flavonoides connus pour leur effet anti inflammatoire (Williams et al.,2000), et les composés terpéniques sont dotés de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment : activité cytotoxique, anti tumorale , anti bactérienne et phytotoxique (Rodriguez et al.,1976) efficacité de leur huile par rapport aux antibiotique standard.
- ***Pulicaria dysenterica***: la décoction de la plante est utilisé comme agent antidiarrhéique (Nickavar et al .,2003).

2.5 Metabolites secondaire de genre *Pulicaria* :

2.5.1 Les Flavanoides

2.5.1.1 Généralité :

Les flavonoïdes sont des substances naturelles qu'on trouve dans presque toutes les plantes. Ils donnent des couleurs comme le jaune, l'orange et le rouge à certaines parties des plantes. On les trouve surtout dans les fruits (comme les agrumes, où ils peuvent représenter jusqu'à 1% du fruit frais), les légumes, et aussi dans des boissons comme le vin rouge, le thé, le café et la bière. Ils sont aussi présents dans plusieurs plantes utilisées en médecine (Crozier et al.,2006).

2.5.1.2 La structure des flavanoides :

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C) correspondant à la structure du diphenylpropane cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) .

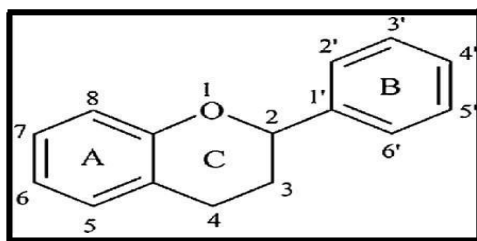


Figure5 :Structure moléculaire de base des flavanoides des (benzo-α-prône)

(Karabín et al.,2015).

I.2. Propriétés des flavonoïdes :

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes [5].

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée «vitaminique P».

Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette activité :

- ✓ Des propriétés antioxydants, piègeurs de radicaux libres.
- ✓ Des propriétés inhibitrices d'enzymes...

À côté de cette action principale « vitamine P », les flavonoïdes présentent plusieurs activités : antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses (**Middelton et al.,1993**) ainsi que d'autres activités particulières : diurétiques, et antispasmodiques.

I.3. Identification spectrale :

a. 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 (**Jurd et al.,1962**) Figure 2).

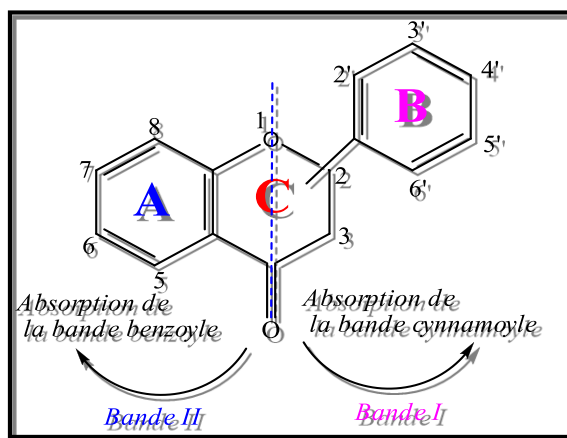


Figure 6 : Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.

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** (Markham,1982)

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

Tableau 3: Principaux déplacements des bandes I et II en présence de divers réactifs.

Les réactifs	λ_{\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+H₃BO₃	+12 à +36		Ortho di-OH sur B
	+05 à +10		Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
AlCl₃	Une seule bande entre 420-430.		Ortho-di-OH sur B avec 5-OH
	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6.

MeOH / (AlCl₃ + HCl)	+35 à +55		5-OH et 3-OMe
	+50 à +65		OH en 3 avec ou sans OH en 5
AlCl₃ / (AlCl₃+HCl)	-20 à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360].		Ortho-di- OH sur B.
	-20 à -25		Ortho-di-OH sur A et ortho-di-OH sur B ou tri-OH sur B.

b. La spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN):

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques (Wilson et al.,1986)

La RMN du proton (¹H) nous informe sur l'environnement des différents protons dans la molécule par les valeurs des déplacements chimiques et donc leurs positions sur la molécule ainsi que leurs nombres. Tandis que la RMN du carbone 13 (¹³C) nous donne des informations sur le nombre d'atomes de carbone et le type de leurs hybridation et l'environnement où ils se trouvent.

♦ **Protons aromatiques**

Protons du noyau A :

Selon les substitutions possibles, les résonances et les multiplicités des protons H₅, H₆ et H₈ sont résumées dans le tableau 2:

**Tableau 4 : Déplacement et multiplicité des protons du noyau A
(Harborne,1988 ; Harborne,1973)**

Flavonoïdes	H ₅		H ₆		H ₈	
	δ (ppm)	J(Hz)	δ (ppm)	J(Hz)	δ (ppm)	J(Hz)
5, 7-dihydroxy	-	-	6.00-6.20 (d)	2.5	6.30-6.50 (d)	2.5
5-OH, 7-OR (R: sucre)	-	-	6.20-6.40 (d)	2.5	6.50-6.90 (d)	2.5
5, 6, 7-OR (R=H, sucre) 5, 7, 8-OR	-	-	- 6.3 (s)	-	6.3 (s) -	
7-OR R=H, sucre	8.00 (d)	9.00 (d)	6.70-7.10 (dd)	9.0 2.5	6.70-7.00 (d)	2.5

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 substituents dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C (Tableau 3).

Tableau 5: Déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B (mono- substitue)
(Harborne,1988 ; Harborne,1973)

Flavonoïdes	Déplacement chimique (ppm) H_2' , H_6' ($J \approx 8.5\text{Hz}$)	Déplacement chimique (ppm) H_3' , H_5' ($J \approx 8.5\text{Hz}$)
4'-hydroxyflavone	7.70 - 7.90 (d)	6.50 - 7.10 (d)
4'-hydroxyflavonol	7.90 - 8.10 (d)	6.50 - 7.10 (d)

Tableau 6 : Déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B (di-substitue)
(Harborne,1988 ; Harborne,1973)

Flavonoïdes	H_2'		H_5'		H_6'	
	δ (ppm)	$J(\text{Hz})$	δ (ppm)	$J(\text{Hz})$	δ (ppm)	$J(\text{Hz})$
Flavone (3',4'-OH ; 3'-OH, 4'-OMe ; 3'-OMe, 4'-OH)	7.2 – 7.3 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.3 – 7.5 (dd)	2.5, 8.5
Flavonol (3',4'-OH ; 3'-OH, 4'-OMe)	7.5 – 7.7 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.6 – 7.9 (dd)	2.5, 8.5
Flavone (3',4'-OH ; 3'-OMe, 4'-OH)	7.6 – 7.8 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.4 – 7.6 (dd)	2.5, 8.5

Protons du noyau C :

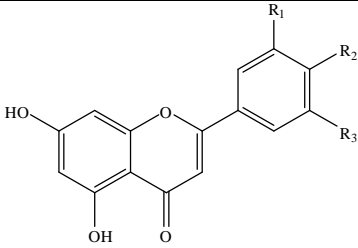
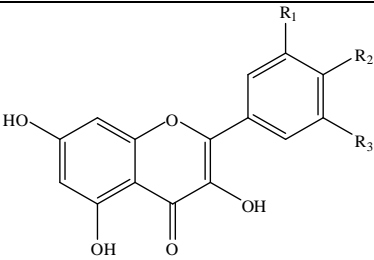
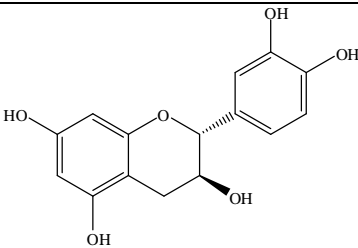
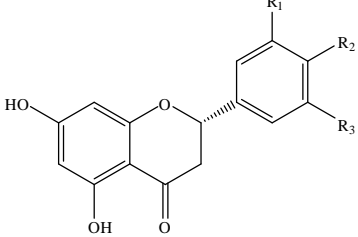
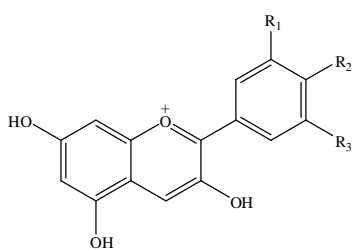
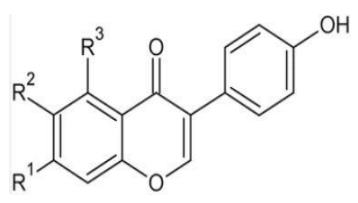
Le proton H_3 dans la Flavone, résonne sous forme d'un singulet dans l'intervalle {6.20-6.40 ppm} (Voirin ,1983), mais dans le cas des flavonols il disparaît.

♦ **protons aliphatiques :****Protons methoxyle :**

Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.4 et 3.9 ppm (Abd Elchakour,1987).

2.5.1.3 les différents classes des flavanoides :

Tableau 7: Différents classes des flavanoides [30]

Classes	Structures	R ₁	R ₂	R ₃	Exemple
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanol		OH	OH	H	Catéchine
Flavonones		H	OH	H	Narigénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

➤ Les flavonoïdes sont des composés largement répandus dans le genre *Pulicaria*. Ce sont des marqueurs chimiotaxonomiques, et leur importance biologique a été largement démontrée. Le tableau suivant (**Tableau 4**), resume quelques flavonoides isolés de plusieurs espèces du genre *Pulicaria*.

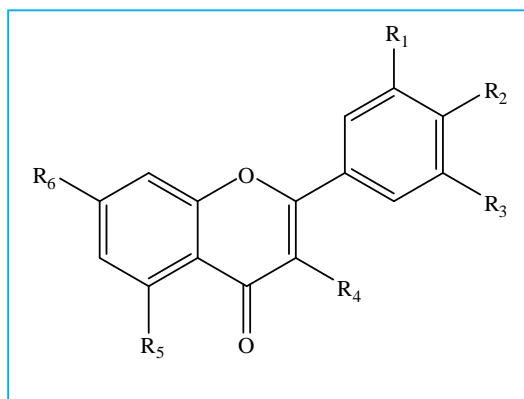


Tableau 8: Flavonoides présents dans quelques espèces du genre *Pulicaria*.

Espaces	Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Références
<i>P. arabica</i>	Quercétine	OH	OH	H	OH	OH	OH	(El-Negoumy et al.,1982)
	Quercétine-3-méthyléther	OMe	OH	H	OH	OH	OH	(Ramadan,1998)
	Quercétine-3,7diméthyléther	OMe	OH	H	OMe	OH	OH	
<i>P. crispa</i>	Quercétine-3-glucoside	O_Glc	OH	H	OH	OH	OH	(A.M et al;Rizk& Shams,1982)
	Quercétine-7-glucoside	OH	OH	H	O_Glc	OH	OH	
	Rhmnetine-3-galactoside	O_Glc	OH	H	OMe	OH	OH	
<i>P. dysenterica</i>	Kaempférol-3 ,6,7-triméthyléther	OMe	OH	OMe	OMe	H	OH	(Pares et al.,1981)
	Quercétine-3-glucuronide	O-Glc	OH	H	OH	OH	OH	(Williams et al.,2000)
	Quercetagetin-3,7,3'-triméthylether	OMe	OH	OH	OMe	OMe	OH	
<i>P. odora</i>	Kaempferol-7-glucoronide-3-methylether-6-hydroxy	OH	OH	OMe	O-Glc	H	OH	

	Quercetageitin-7-glucoside-6-methylether(Patuletin7-glucoside)	OH	OH	OMe	O-Glc	OH	OH	(Williams et al.,2003)
--	--	----	----	-----	-------	----	----	------------------------

2.5.2 Les composés terpéniques :

2.5.2.1 Généralité :

Les terpènes (ou terpénoïdes) sont des substances que l'on trouve souvent dans les plantes. Ils ne sont pas toujours essentiels pour la vie, mais ils jouent parfois un rôle dans le fonctionnement des cellules. Ils sont fabriqués à partir de petites unités contenant 5 atomes de carbone.

On trouve des terpènes chez tous les êtres vivants. Ils ont des formes et des propriétés très variées, et ils peuvent avoir différentes actions sur l'organisme. Beaucoup sont utilisés dans l'industrie, par exemple pour faire des parfums, des cosmétiques, des arômes ou des colorants. Certains terpènes sentent bon, comme le menthol ou le thymol, qu'on trouve dans les huiles essentielles (Lamarti et al.,1994).

2.5.2.2 Structure des terpénoïdes :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte: leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc) (Malecky,2005).

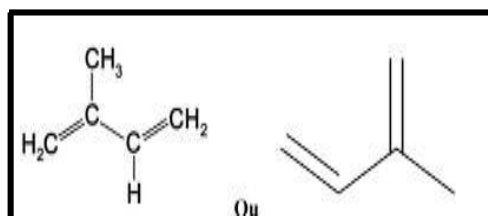


Figure 7 : structure de base de l'isoprène (Khenaka,2011)

➤ **Les monoterpènes.**

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes). Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage «tête-queue» (Ayad,200) Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles: les monoterpènes linéaires (acycliques), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) et tricyclique (Malecky,2005).

➤ **Les sesquiterpenes.**

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures comme le β -Cadinène ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones. Ils peuvent être acycliques, monocyclique, bicycliques, tricyclique ou polycyclique (Belbache,2003).

- Les composés terpéniques présents dans certaines espèces du genre *Pulicaria* sont variés et contribuent à leurs propriétés aromatiques et médicinales. Voici quelques exemples de composés terpéniques que l'on peut trouver dans ce genre :

Tableau 9 : Composées terpéniques de quelques espèces du genre *Pulicaria*.

Espèces	Composés	Référence
<i>Pulicaria arabica</i>	Dérivés caryophyllene	(Hafez,1987)
<i>Pulicaria crispa</i>	Pulicariolid (10 α ,14-Epoxy-8- epiconfartin) Hydroxy-4-oxoxanthenolide/epoxyhydroxy-guaienoli de Pulicariolid(10 α ,14-Epoxy-8-epiconfartin) Dihydroxyguaiadienolide/epoxyhydroxyguaienolide Xanthatin/epixanthatin Hydroxyacetoxyl Xanthanolide. CrispiosideB Pulicariolid(10 α ,14- Epoxy-8- epiconfartin) Pulicaricacid Dihydropulicaricacid Xanthatin/Epixanthatin isomer Puliglutoicacid. Pulicaricacid Pulicanadiene-C Salvicinolide Puliglutone Unknown triterpenoid Salvicinolidemethylester isomer Hautriwaicacid Hautriwaicacid	(El-Sabagh et al.,2021)

2.5.3 Les huiles essentielles :

2.5.3.1 Définition :

Les huiles essentielles sont des liquides huileux hydrophobes constitués de concentrés aromatiques volatils obtenus à partir de diverses parties de plantes telles que les fleurs, les bourgeons, les graines, les feuilles, les brindilles, les écorces, le bois, les fruits et les racines (Sumonrat et al., 2008). Elles possèdent une valeur olfactive et gustative fortement aromatique. Elles sont obtenues par distillation ou par extraction chimique, par des solvants (eau, alcool ou autre).

2.5.3.2 Composés chimiques des huiles :

Les constituants des huiles essentielles appartiennent exclusivement à deux groupes distincts: les terpènes (mono et sesquiterpènes) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Bruneton, 1999).

2.5.3.3 localisations de l'huile essentielle :

Les huiles essentielles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Ils peuvent être stockées dans tous les organes végétaux (**Bruneton ,1999 ; Rahili,2002 ; Tenschler et al.,2005 ; Loupy,2006**)

- Les fleurs (Oranger, rose, lavande, menthe).
- Les feuilles (Eucalyptus, menthe, thym, laurier, sauge, aiguilles de pin, le est liée à leurs larges spectres basilic).
- Les fruits (Fenouil, poivre, épicarpes des citrus).
- Les graines (Noix de muscade, coriandre).
- Le bois et les écorces (Cannelle, camphrier, bois de rose).
- Les poils sécréteurs épidermiques qui s'accumulent dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule rencontrés et souvent chez les Lamiaceae, les Myrtaceae et les Apiaceae (**Fahn,1988**)

2.5.3.4 Domaines d'utilisation des huiles essentielles :

Auparavant, les huiles essentielles étaient principalement utilisées à des fins médicinales sur les personnes et les animaux. Les qualités antibactériennes des huiles essentielles ont récemment été utilisées dans le secteur alimentaire pour améliorer la durée de conservation des produits alimentaires. Il est utilisé pour fabriquer des savons, des désinfectants, des antioxydants et d'autres produits connexes dans les industries des parfums et des cosmétiques (**Hesham et al.,2016**).

Les huiles essentielles du genre *Pulicaria* sont moins connues que celles d'autres plantes aromatiques, mais elles possèdent des propriétés intéressantes. Ces huiles peuvent être extraites de différentes espèces de *Pulicaria*, qui sont souvent utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs effets bénéfiques. Elles peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques et antioxydants (**tableau 6**)

Tableau 1 0: Composés majoritaires des huiles essentielles du genre *Pulicaria*

Espèce	Composés majoritaires	Références
<i>P. arabica</i>	epi- α -cadinol δ -cadinene α -cadinol Germacrene D-4-ol	(Ammar et al.,2020)
<i>P. crispa</i>	Carvotanacetone	(Dekinash et al.,2019)
<i>P. odora</i>	Thymol Thymolisobutyrate	(Hanbali et al.,2005)

Chapitre 2 :

Etude phytochimique

I. Etude phytochimique de la plante

1.1 Matériel végétal:

Notre plante a été récoltée en décembre 2024 dans la région de Tamnrasate. Après séchage dans un endroit sec à l'abri de la lumière et de la chaleur, les feuilles et les tiges ont été pulvérisées, broyées, puis pesées pour obtenir une masse de 300 g.

1.2 Extraction de la plante :

La matière végétale obtenue ($m = 300$ g) a subi une extraction solide-liquide à l'aide d'un Soxhlet dans un solvant moyennement polaire (chloroforme). On ajoute la matière végétale dans la cartouche en cellulose épaisse et chloroforme dans le ballon, le solvant se condense dans le réfrigérant puis retombe dans le corps en vers pour extraire les substances qui sont dans la cartouche. Cette extraction est répétée 3 fois avec renouvellement du même solvant, Après filtration, concentration et séchage à une température n'excédant pas 40°C , nous avons obtenu 12.5g de l'extrait chloroformique. (tableau7)



Figure 8: Extraction de la plante par Soxhlet.

Les parties aériennes de la plante sont séchées, la poudre obtenue a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O} : 80/20 : \text{v/v}$) à température ambiante pendant 48h. Le 1^{er} extrait récupéré est filtré puis concentré sous pression réduite à sec, cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement de solvant.

Après concentration et séchage à une température n'excédant pas 40°C , nous avons obtenu un résidu ($m = 102.1$ g), ce résidu est ensuite dilué avec 500 mL d'eau distillée.

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

Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non-miscible à l'eau et de polarité croissante en commençant par AcOEt (3*300ml) et en dernier le *n*-BuOH (4*300ml).

Les deux phases organiques récupérées sont évaporées à sec et pesées, les masses sont données dans le tableau ci-dessous (**tableau7**) :

Tableau11: Rendement des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
m=300g	CHCl ₃	12.5	4.16
	AcOEt	1.2	0.4
	<i>n</i> -BuOH	4.3	1.43

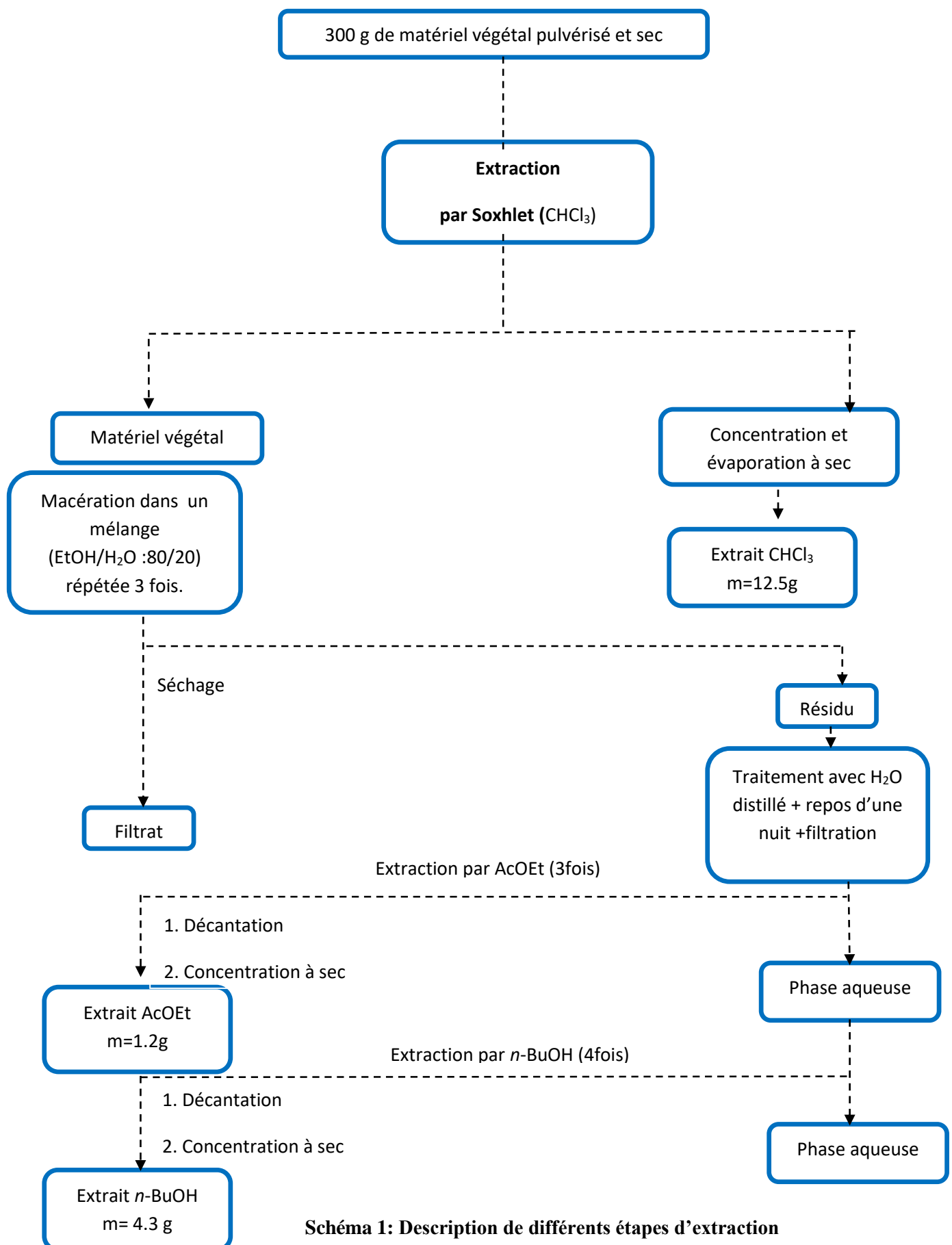


Schéma 1: Description de différents étapes d'extraction

1.3 Séparations et purifications :

1.3.1. Tests chromatographiques

Les profils CCM dans les différents systèmes d'élution), ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1) et ($\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 10/0,5/0,25) et HPLC des extraits obtenus révèlent la richesse d'extrait AcOEt en flavonoïdes, comparativement aux autres extraits. Nous avons choisis l'extrait AcOEt à cause de la richesse en flavonoïdes (**figure8, figure 9**).

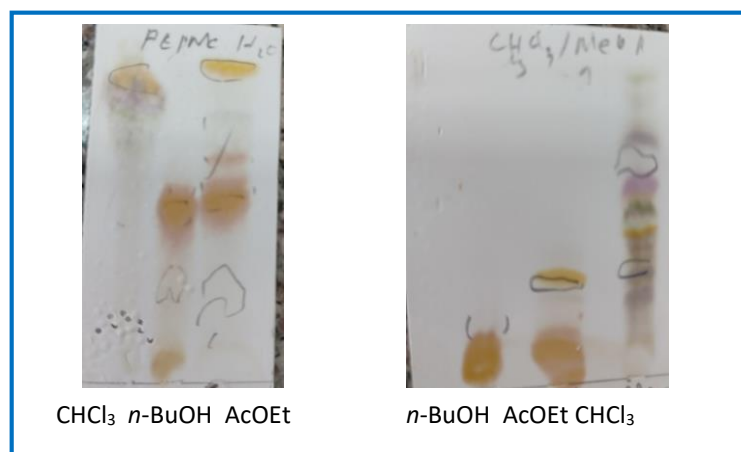
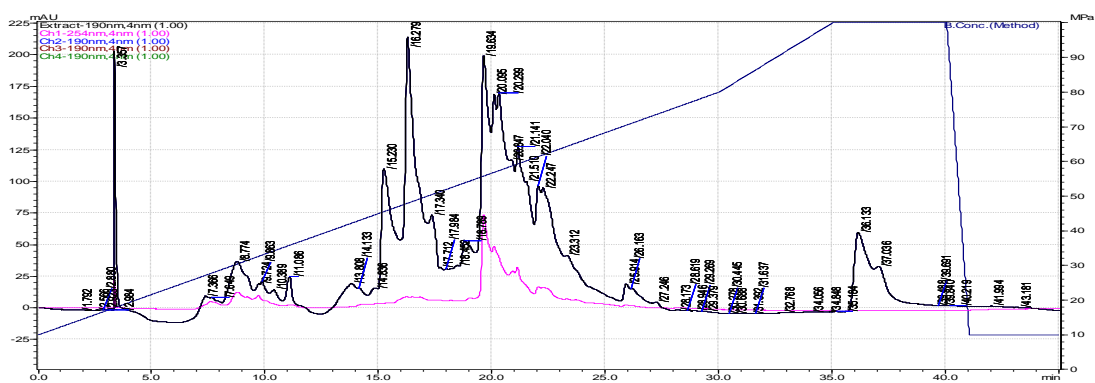


Figure 9: Comparaison entre les extraits sur plaque CCM



Chromatogramme CLHP de l'extrait AcOEt ($\lambda=254\text{nm}$).

➤ **Conditions de CLHP Analytique Shimadzu LC 20 AT:**

- **Colonne :** RESTEK ultra C18, 5 μm , 250x46 mm.
- **Eluent :** ACN/ H_2O (5–100% ACN, 35 min).
- **Débit :** 0.8mL/min.
- **Température :** 30°C.

I.3.2. Séparation sur colonne

1g d'extract d'acétate d'éthyle est dissout dans le minimum de MeOH et mélangé avec une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée en haut de la colonne de gel de silice préparée dans l'acétate d'éthyle, l'élution est réalisée par un gradient de polarité du système (AcOEt-MeOH-H₂O) commençant par l'acétate d' 100% et en augmentant la polarité par l'addition progressive du (MeOH-H₂O) (**figure10 ; Tableau 8**).

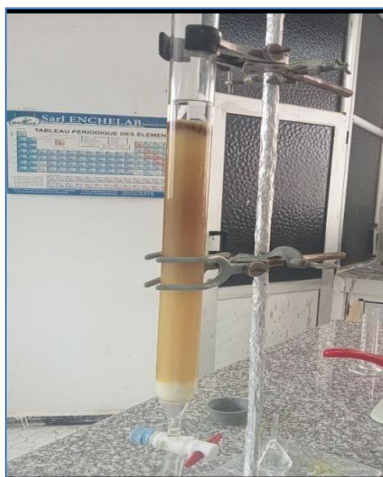


Figure 10: séparation sur Colonne gel de silice

Des fractions de 20 ml sont recueillies, la progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau 3.

Tableau 12: Résultats de Fractionnement de l'extract AcOEt

Lot de fraction	AcOEt	MeOH(%)	H ₂ O
1-19	10.0	0	0
20-45	10.0	0.5	0.25
46-72	10.0	1.0	0.50

Les fractions sont analysées par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice avec différents systèmes d'élution (9.5/0.5 :CHCl₃/MeOH), (8/2 : CHCl₃/MeOH), (10/1/0.5 : AcOEt/MeOH/H₂O), les plaques CCM sont visualisées sous la lumière UV (254et 365nm) puis révélées avec l'acide acétique (50%) et ensuite séchées à 100°C. Selon les résultats donnés par ces plaques CCM, nous avons pu regrouper les fractions qui ont la même composition (tableau 9, Figure10).

Tableau 13: Regroupement final des fractions de la colonne

Lot	N°de fraction	Observation
1-7	F1	Trace
8-12	F2	Produit pure (P1)
13-14	F3	Mélange inséparable
15-17	F4	Mélange de faible quantité
18-20	F5	Mélange de faible quantité
21-26	F6	Mélange de faible quantité
27-30	F7	Mélange de faible quantité
31-34	F8	Mélange inséparable
35-36	F9	Produit pure (P2)
37-39	F10	Mélange inséparable
40-45	F11	Produit pure (P3)
46-72	F12	Trace

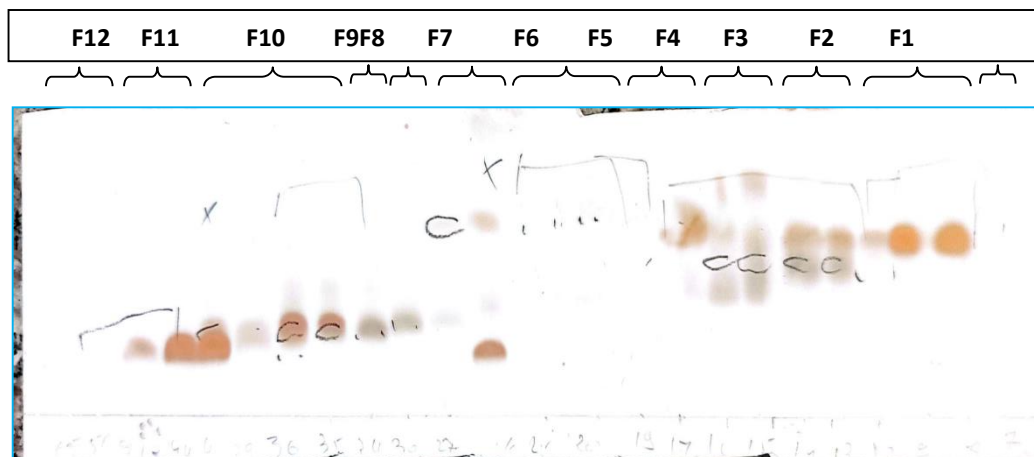


Figure 11 : regroupement final des fractions sur plaque CCM

II. Résultats et discussion

Les composés isolés P₁, P₃ ont été identifiés par les analyses spectrales, particulièrement UV-Visible et RMN¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC.

II.1. Identification de produit P₁

a. Comportement chromatographique :

Système	SI
R _f	0.86
Fluorescence sous lumière de Wood	Jaune

- **SI** : (AcOEt : MeOH : H₂O) (10:1 :0.5) v/v.

- **b. Données spectroscopiques RMN¹H :**

- **Interprétation:**

- . Le comportement chromatographique dans les différents systèmes indique que le composé P₁ est un flavonoïde aglycone.
- Le spectre RMN ¹H du produit P₁ (Figure 11) montre des signaux caractéristiques du dihydrokaempférol, répartis comme suit :
- Un doublet à $\delta = 7.99$ ppm d'intégration 2H ($J = 8.8$ Hz) attribuable aux protons **H-2'** et **H-6'** du cycle B.
- Un doublet à $\delta = 6.99$ ppm d'intégration 2H ($J = 8.8$ Hz) correspondant aux protons **H-3'** et **H-5'**.

- Un doublet à $\delta = 5.94$ ppm d'intégration 1H ($J = 2.0$ Hz) attribuable au proton **H-8** du cycle A.
- Un doublet à $\delta = 7.89$ ppm d'intégration 1H ($J = 2.0$ Hz) attribuable au proton **H-6** du cycle A.

Le spectre RMN- ^1H montre aussi la présence de deux doublets à $\delta = 4,98$ ppm et $\delta = 4,55$ ppm (1H chacun, $J = 11.6$ Hz), correspondant respectivement aux protons **H-3** et **H-2** du cycle central (C), la valeur de constante de couplage entre les protons **2** et **3** ($J = 11.6$ Hz), montre une stéréochimie *trans* du dihydroflavonol.

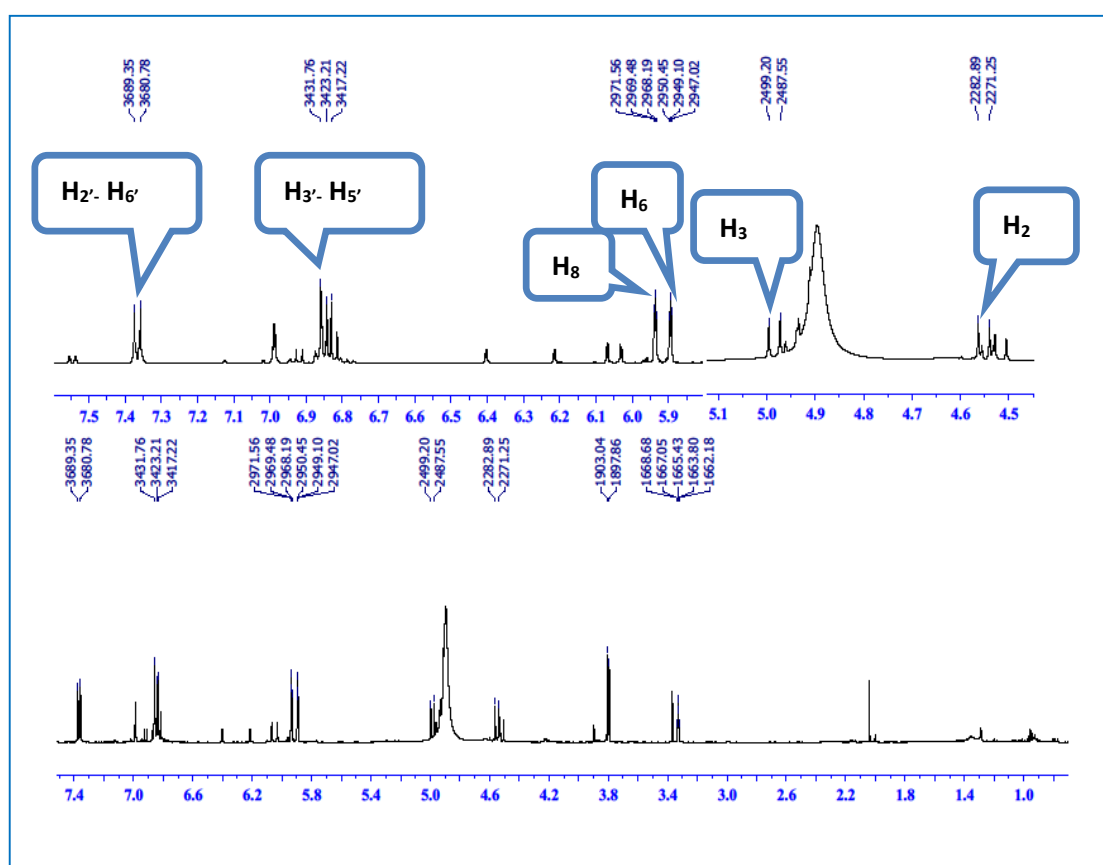
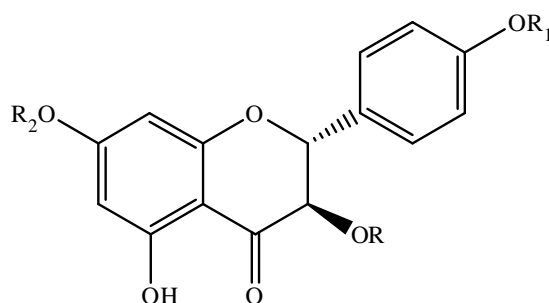
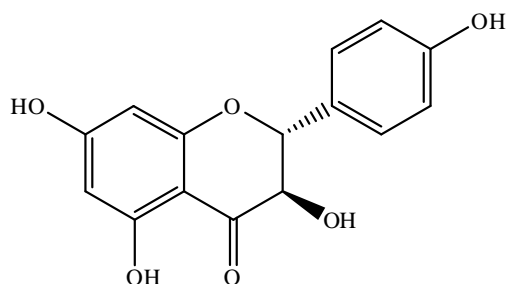


Figure 12: Spectre RMN ^1H du produit P1 (CD_3OD , 500 MHz)



Le spectre RMN ^{13}C du produit P1 (Figure 12) montre 13 signaux de forte intensité, correspondant aux 13 carbones de l'aglycone (génine), confirmant la structure du **dihydrokaempférol**.



Dihydrokaempférol

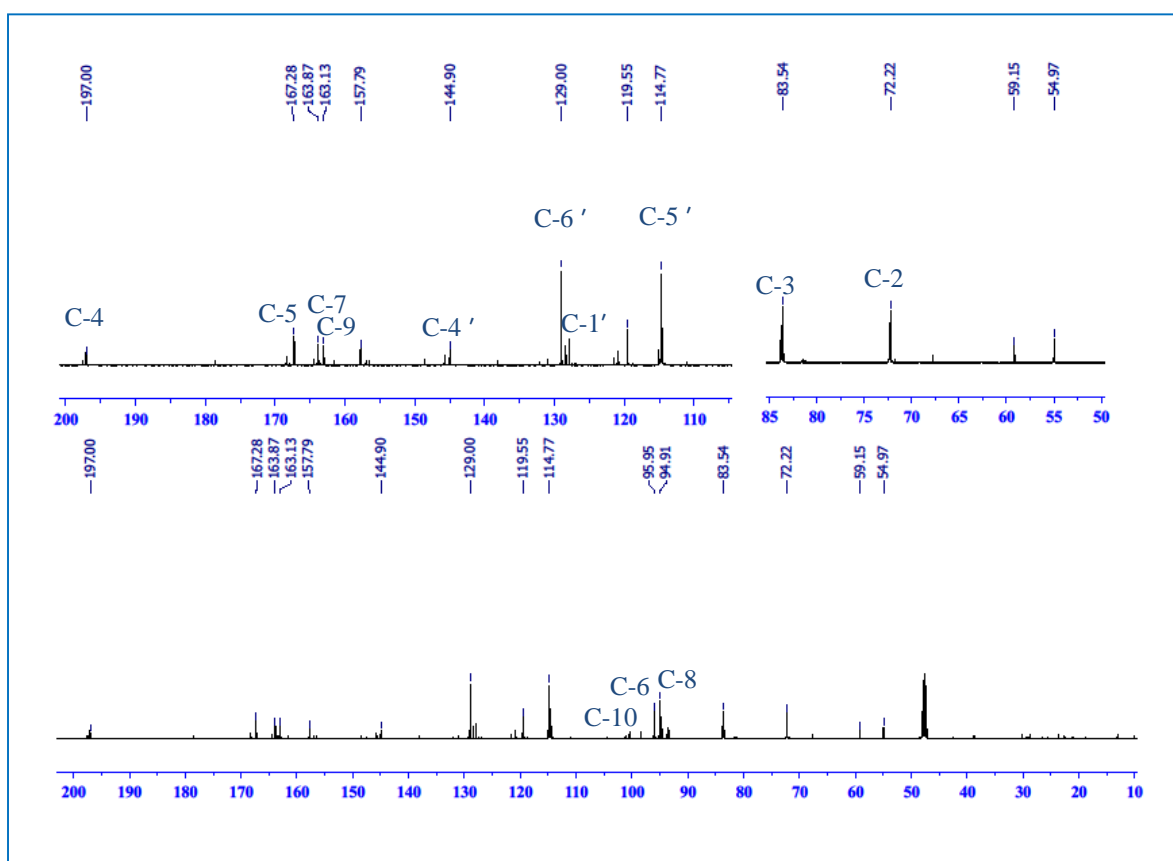


Figure 13: Spectre RMN ^{13}C du produit P1 (125MHz/ CD_3OD)

Tableau 14: données spectroscopie RMN¹H (500MHz/CD₃OD) du produit P₁

Produit P1 (CD ₃ OD)		
Atom	δ _C	δ _H m (J Hz)
2	83.5	5.28 d (8.7)
3	72.2	4.92 d (8.7)
4	197.0	-
5	167.3	-
6	94.8	6.23 d (2.0)
7	163.9	-
8	95.9	6.43 d (2.0)
9	163.1	-
10	100.4	-
1'	127.9	-
2'	129.7	7.86 d (2.1)
3'	114.8	-
4'	144.9	-
5'	114.8	6.89 d (8.50)
6'	129.7	7.61 dd (8.5-2.1)

II.2. Identification de produit P₃ :

a. Comportement chromatographique :

Système	SI
R _f	0.42
Fluorescence sous lumière de Wood	noir-violette

- SI : (AcOEt : MeOH : H₂O) (10:1 :0.5) v/v.

b. données spectroscopiques :

b.1.données spectroscopique UV-Visible :

Le produit P₃ a été analysé par spectrophotométrie UV-Visible en présence d'une série des réactifs permettant de tirer les observations suivantes (Tableau11, figure13).

Tableau 15: données de la série UV-Visible de produit P₃

Les réactifs	Bande I <i>λ_{max}</i> (nm)	Autres bandes	Bande II <i>λ_{max}</i> (nm)	Interprétation
MeOH	350	-	256	3-OR
NaOH	396	326	271	4-OH
NaOAc	359	-	270	7-OH

NaOAc+H ₃ BO ₄	368	-	261	Présence d'un ortho di-OH sur le cycle B
AlCl ₃	426	-	265	Présence d'un ortho di-OH sur le cycle B
AlCl ₃ +HCl	401	-	270	

➤ **Interprétation :**

1. Le comportement chromatographique dans les différents systèmes indique que le composé P3 est un flavonoïde monoglycosylé.

2. Ce produit a une fluorescence noire- violette sous lumière de Wood (365nm).

3. Le spectre UV de produit P3 enregistré dans le MeOH permet d'observer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ et l'autre à $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$ indiquant qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone (**3-H**) ou flavonol substitué en **3** (**3-OR**).

4. L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +46 \text{ nm}$) avec une augmentation de l'intensité lumineuse comparativement au spectre MeOH indique la présence d'un OH en position **4'**, la présence d'une nouvelle bande à $\lambda_{\text{max}}=326\text{nm}$ montre la présence d'un OH en position **7**.

5. L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +5\text{nm}$) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui confirme la présence d'un OH en position **7**.

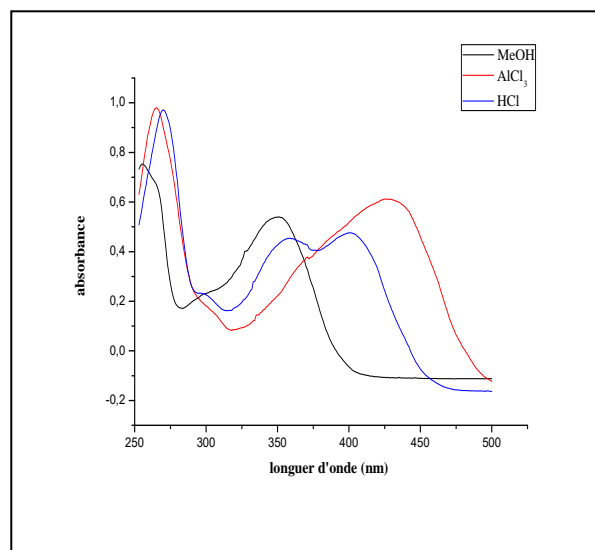
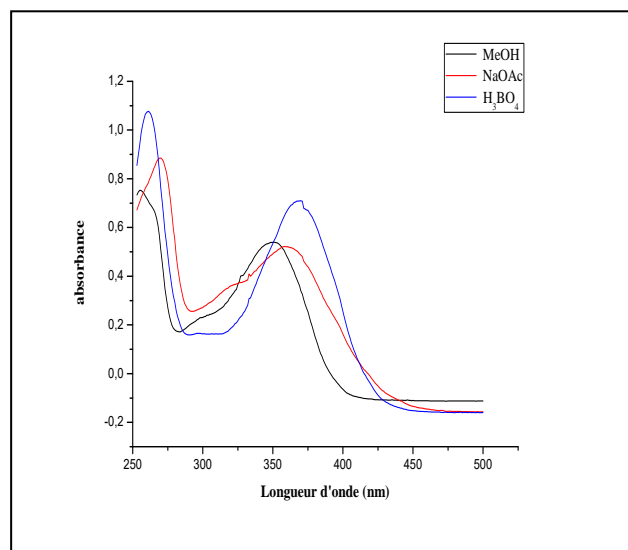
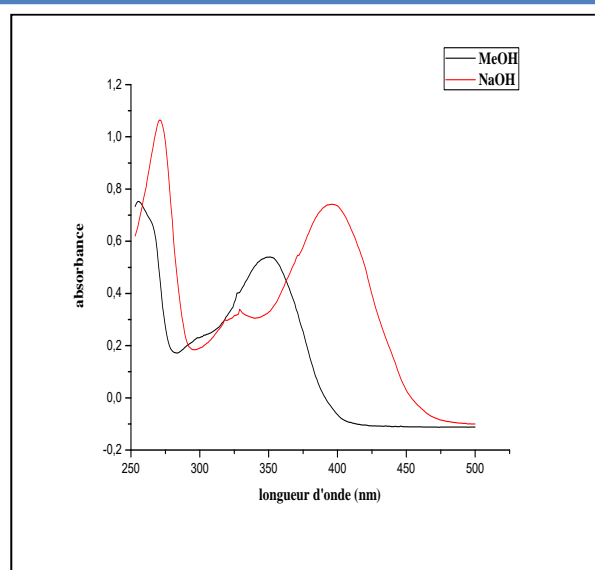
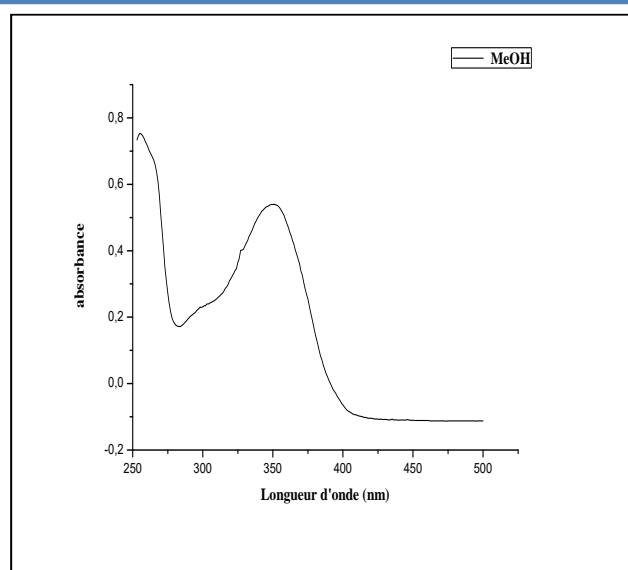
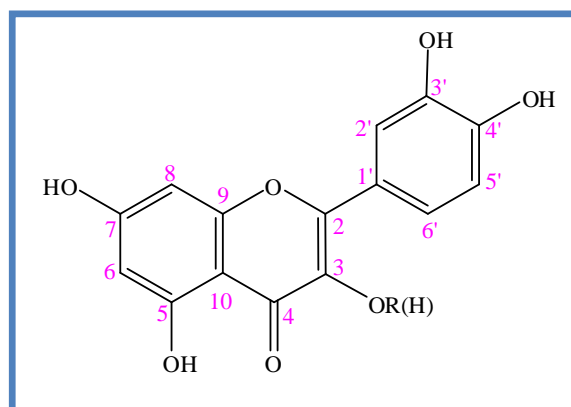
6. L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +51 \text{ nm}$) en comparant le spectre (AlCl₃) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, indique la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position **5**.

7. La présence d'un effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -25\text{nm}$) après l'addition de HCl au système (MeOH + AlCl₃) indique la présence d'un système ortho di-hydroxyle sur le cycle B,

Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 32 \text{ nm}$) après l'addition de H₃BO₃ au système MeOH+ NaOAc.

Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 32 \text{ nm}$) après l'addition de H₃BO₃ au système MeOH+ NaOAc.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante pour le produit P₃ :

Figure 13: Série spectrale UV-Visible de produit P₃

b.2. Données spectroscopiques RMN¹H :**Interprétation:**

Le spectre RMN¹H confirme les informations apportées par la spectrophotométrie UV-Visible en montrant les signaux caractéristiques d'un flavonol substitué en position 3, apparaissant comme suit (figure 14) :

1. Un doublet résonnant à $\delta=7.86$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J= 2.1$ Hz (couplage *méta*) attribuable à H-2'.
2. Un doublet dédoublé résonnant à $\delta=7.61$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J=8.5$ et 2.1 Hz (couplage *méta* avec H-2' et couplage *ortho* avec H-5') attribuable à H-6 '.
3. Un doublet résonnant à $\delta=6.89$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J=8.5$ Hz (couplage *ortho*) attribuable à H-5'.
4. Un doublet résonnant à $\delta=6.43$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J=2.0$ Hz (couplage *méta*) attribuable à H-8.
5. Un doublet résonnant à $\delta=6.23$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J= 2.0$ Hz (couplage *méta*) attribuable à H-6.
6. Un doublet à $\delta=5.19$ ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage $J=7.8$ Hz caractéristique d'un proton anomérique du sucre (H-1''), La grande constante de couplage ($J=7,8$ Hz) de H-1'' indique une configuration β du sucre.

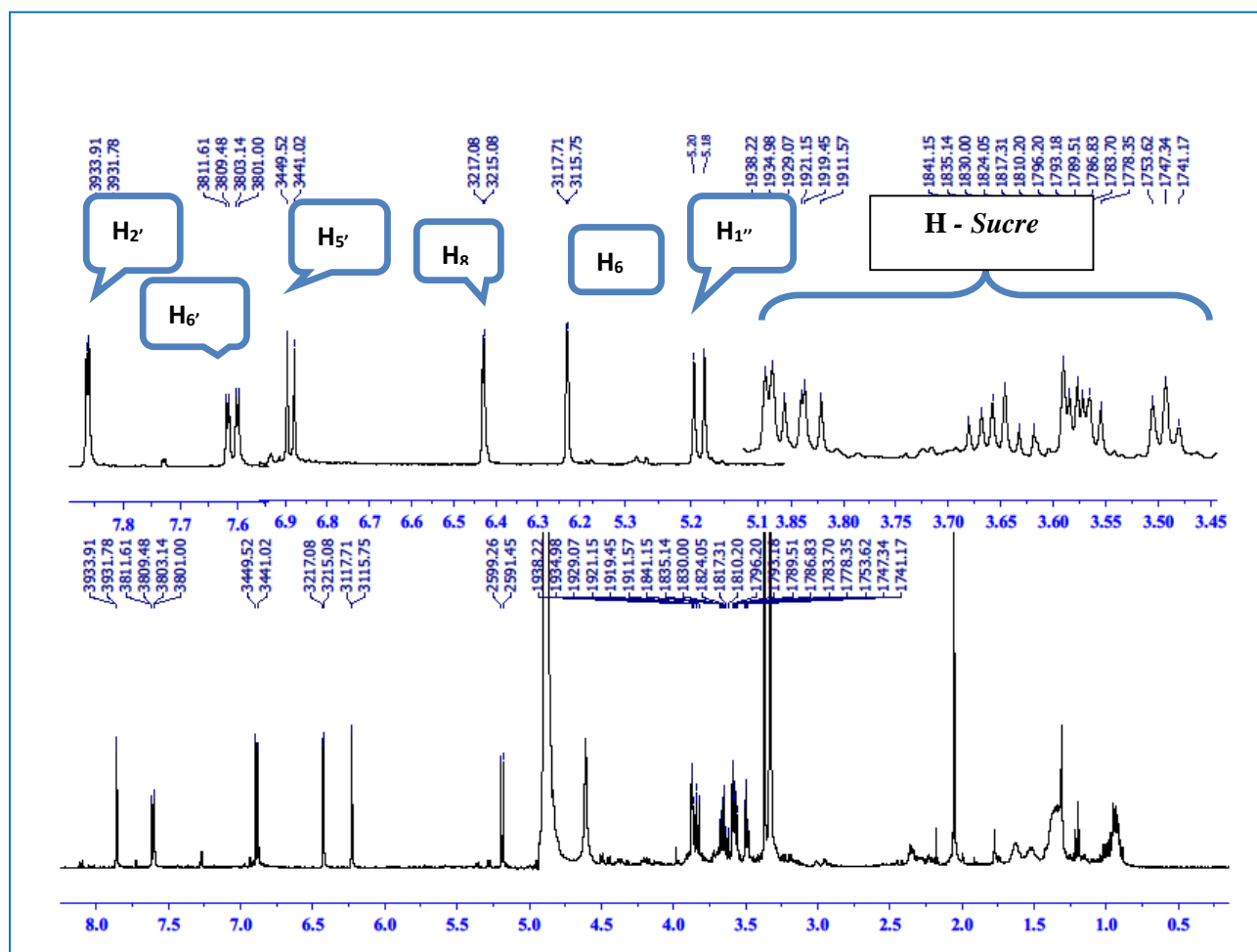


Figure 15. Spectre RMN ^1H du produit P3 (CD_3OD , 500 MHz)

L'analyse des spectres COSY (figure 15) et HSQC (figure 16) permet d'identifier le sucre comme étant β -D-galactopyranoside à partir de l'anomère à 5,39 ppm ($J = 7,4$ Hz), caractérisé par les protons $\text{H}-2''$, $\text{H}-3''$, $\text{H}-4''$, $\text{H}-5''$, $\text{H}-6''$.

L'analyse des spectres COSY (figure 15) et HSQC (figure 16) permet d'identifier le sucre comme étant β -D-galactopyranoside à partir de l'anomère à 5,39 ppm ($J = 7,4$ Hz), caractérisé par les protons $\text{H}-2''$, $\text{H}-3''$, $\text{H}-4''$, $\text{H}-5''$, $\text{H}-6''$.

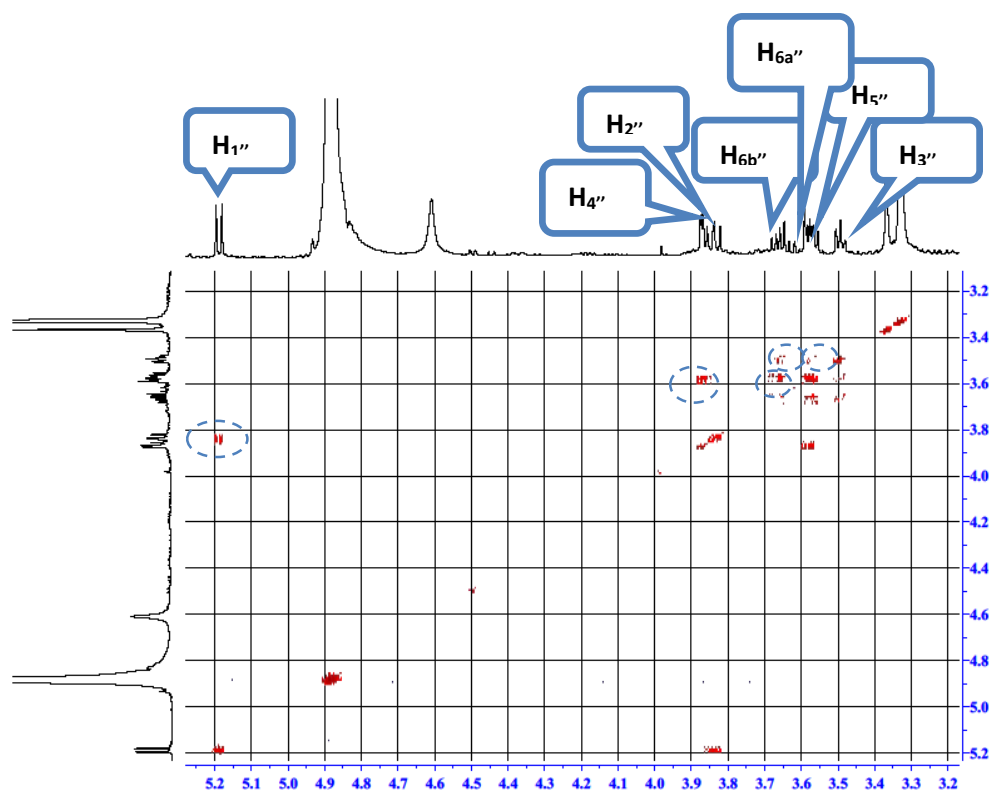


Figure 15: Spectre COSY du composé P3.

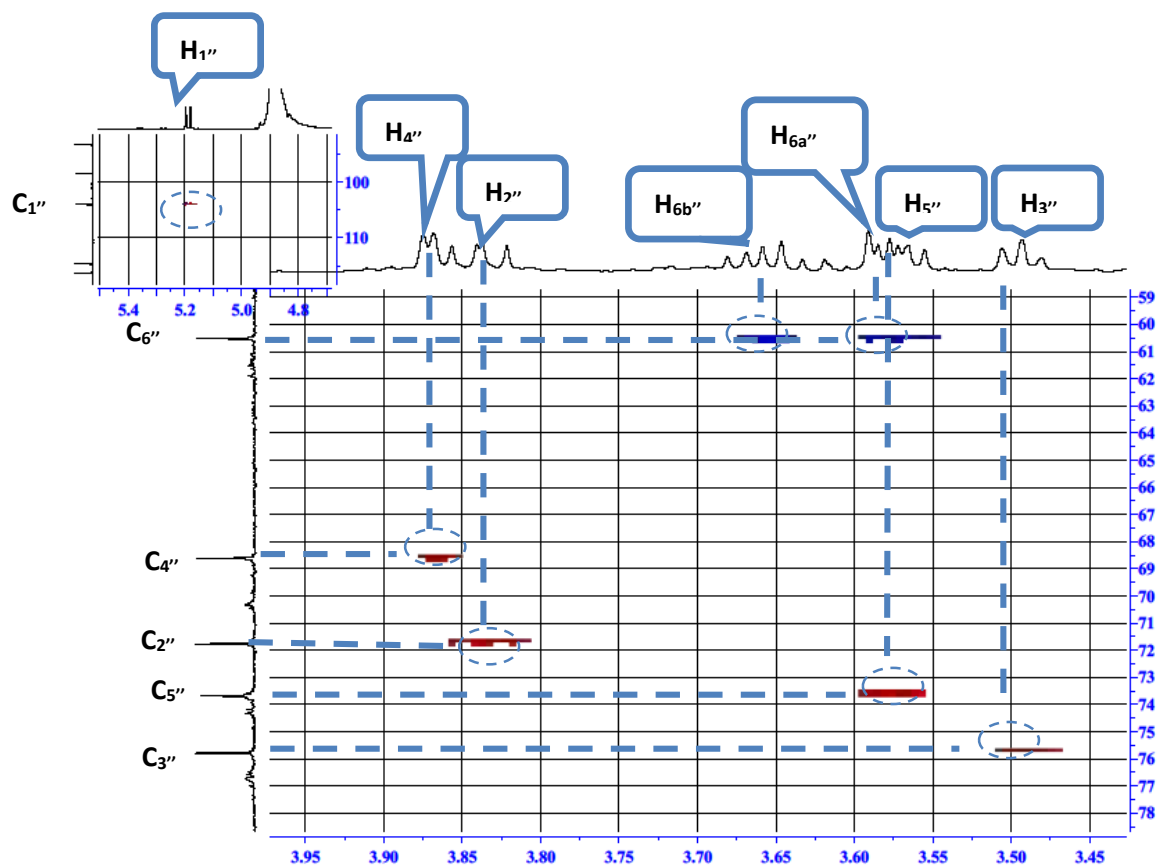


Figure 17: Spectre HSQC du composé P3.

Les expériences HSQC, COSY H-H et HMBC combinées, permettent d'identifier tous les carbones du squelette flavonique (figure 17) (tableau xxx).

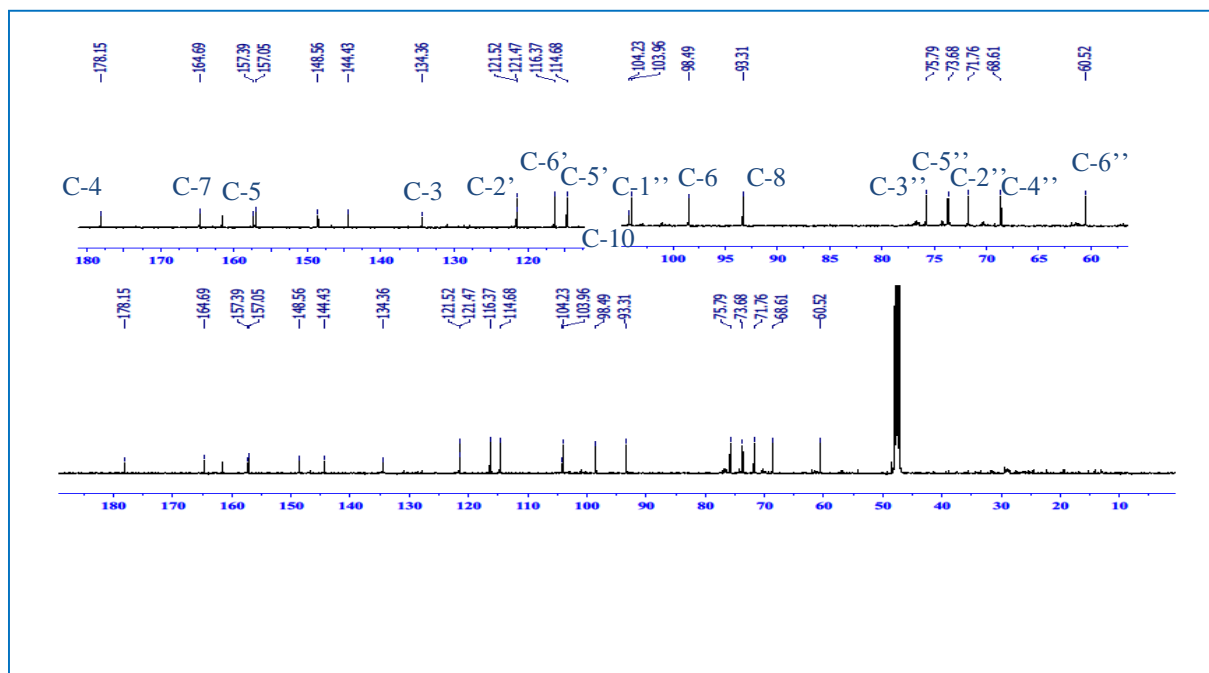


Figure 18: Spectre RMN ^{13}C du composé **P3** (CD_3OD , 125 MHz).

Le spectre HMBC (figures 18) de ce composé nous permet d'observer les couplages proton-carbone à longues distances entre le proton anomérique du sucre et le carbone en position 3 résonant à 134.4 ppm.

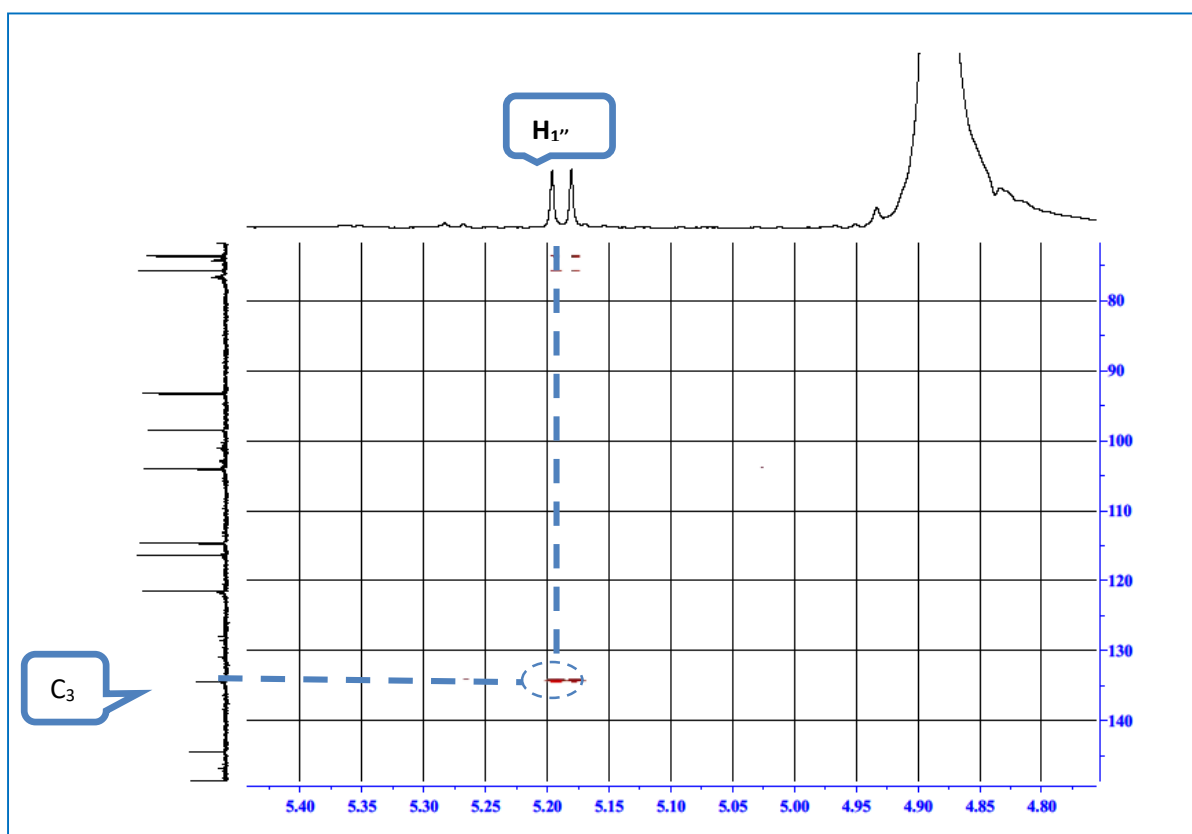
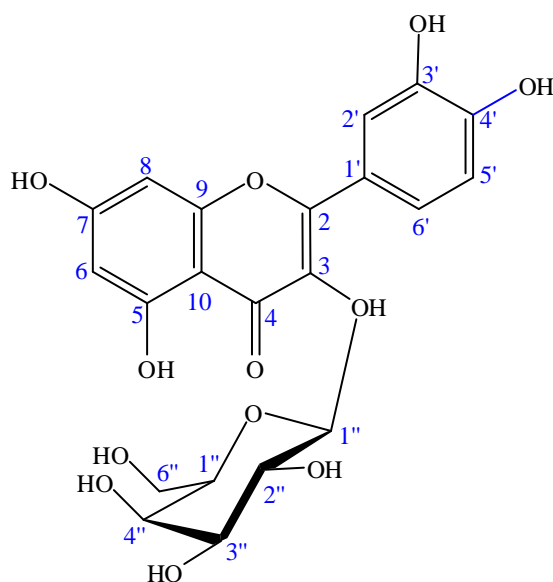


Figure 19: Spectre HMBC du composé **P3** (CD₃OD, 500MHz).**Tableau 16:** données spectroscopie RMN¹H (500MHz/CD₃OD) du produit **P3**

Compose P3 (CD ₃ OD)					
Atom	δ _C	δ _H m (J Hz)	Atom	δ _C	δ _H m (J Hz)
2	157.4	-		Galactose	
3	134.4	-	1''	103.9	5.19 d (7.8)
4	178.1	-	2''	71.7	3.48 dd (7.8-8.2)
5	161.6	-	3''	75.8	3.49 t (6.3)
6	98.5	6.23 d (2.0)	4''	68.6	3.87 d (3.2)
7	164.7	-	5''	73.9	3.57 m
8	93.3	6.43 d (2.0)	6''	60.5	3.60 dd (11.1-6.1)
9	157.0	-			3.63 dd (11.1-3.1)
10	104.2	-			
1'	128.2	-			
2'	116.4	7.86 d (2.1)			
3'	144.4	-			
4'	148.6	-			
5'	114.7	6.89 d (8.50)			
6'	121.5	7.61 dd (8.5-2.1)			

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer au composé **P3** la structure de **Quercétine 3-O-β-D-galactopyranoside**

**Quercétine 3-O-β-D-galactopyranoside**

Chapitre 3 :

Etude biologique de la plante

1. Introduction :

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques (**Bouزيد et al.,2011**).

Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène, des enzymes (Lipoxygénase, peroxydase), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres. Ceux-ci attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, les vitamines ou d'autres constituants (**Popovici et al.,2010**) Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation, pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique (**Cosio et al.,2006**).

Pour cette raison la présente étude est consacrée à évaluer les propriétés antiradicalaire de l'extrait AcOEt à partir d'une plante du genre *Pulicaria* de la famille des Astéracée Le potentiel antioxydant des échantillons était évalué en utilisant les techniques d'inhibition du radical libre DPPH, ABTS et FRAP.

2. Evaluation du potentiel antioxydant :

2.1 Dosage de total phénolique (FCR) :

2.1.1. Principe du dosage :

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de FolinCiocalteu selon une méthode de dosage sur spectrophotomètre (**Kujala et al.,2000**)Ce dernier, est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, 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 maximum aux environs de 750-765 nm.

2.1.2. Protocole expérimental :

➤ Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :

7,5 g de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 mL d'Eau distillée.

➤ Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de Méthanol.

➤ Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois :

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10 mL avec l'eau distillée (9mL).

2.1.3Procédure :

Une prise de 400 μL de chaque dilution sont transférés dans une microplaque est mélange 2000 μL de FCR (1 :10) et 1500 μL Na_2CO_3 (7.5 %), Incubation a l'obscurité pendant

120 min. La lecture est effectuée à une longueur d'onde 765 nm.

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et exprimé en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

2.1.4 Gamme d'étalonnage :

➤ Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

On prend 0,5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 2.5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S1 (0,2mg /mL). Les dilutions sont préparées dans des eppendrofs selon le tableau suivant (Tableau 13):

Tableau 17: Préparation des solutions de l'acide gallique

N ° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume ajouté de MeOH (uL)	175	150	125	100	75	50	25	0
Concentration de l'acide gallique en ug/mL	25	50	75	100	125	150	175	200

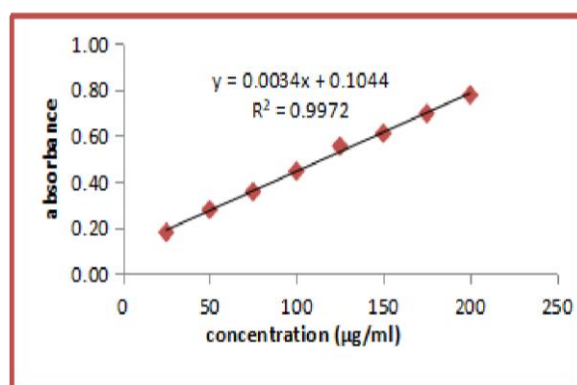


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et est exprimé en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

3.1 Dosage de total Flavonoïde, TFC (Total Flavonoïde Content)

3.1.1 Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre AL^{+3} et les flavonoïdes.

La méthode de Topcu est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

3.1.2 Préparation des solutions

Pour 1M potassium acétate (CH_3COOK), on dissout 9,80 gramme de (CH_3COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution S1.

Pour 10% nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) on pèse 10g de ce produit dans 100 mL d'eau distillé.

➤ Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol pour obtenir la solution (S2).

3.1.3 Procédure

▪ Pour l'extrait

Une prise de 50 uL d'extrait de plante dilué méthanolique est mélangé avec 130 uL MeOH et 10 uL (CH_3COOK) et 10 uL ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), après un repos de 40 min.

La lecture est effectuée à une longueur d'onde 415 nm.

Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 uL extrait et 150 uL méthanol).

▪ 3.1.4 Pour l'étalon

Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine :

On prend 1 mg de la Quercétine et on la dissout dans 5 mL de méthanol pour obtenir la solution 0,2 mg /mL SM.

Les dilutions sont préparées dans des eppendrofs comme la suite :

Tableau 18: Préparation des solutions de la Quercétine

N ° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume ajouté de MeOH (uL)	175	150	125	100	75	50	25	0
Concentration de la Quercétine	25	50	75	100	125	150	175	200

Une prise de 50 uL de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits est mélangé avec 130 uL MeOH et 10 uL (CH_3COOK) et 10 uL ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), après un repos 40 nm, la lecture est effectuée à une longueur d'onde 415 nm.

Les absorbances de courbe d'étalonnage en fonction de leur concentration sont rapportés sur la figure ci-dessous (figure 20) :

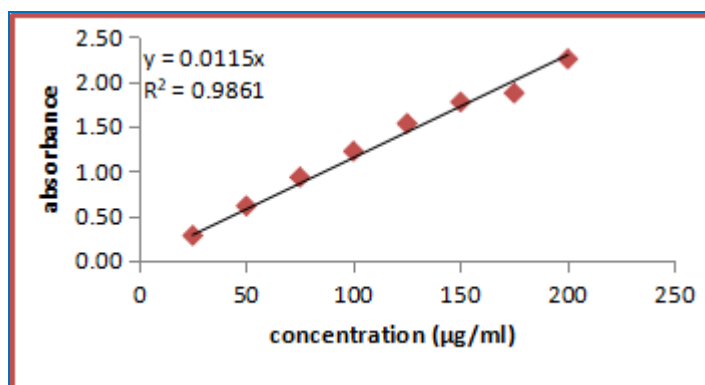


Figure 21: Courbe d'étalonnage de la Quercétine

La teneur en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimé en mg d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

4. Résultats et discussion

4.1. dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Le tableau ci-dessous montre les résultats du Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits.

- La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.
- La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de Quercitainne par gramme d'extrait. (Tableau15).

Tableau 19: résultats des teneurs en polyphénols des 'extraits (CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH)

Extrait	Teneur en polyphénols en mg EAG /g d'extrait	Teneur en flavonoïdes mg EQ/g d'extrait
CHCl ₃	328.66 ±23.09	128.75 ±12.37
AcOEt	426.99 ±9.967	299.25 ±103.59
<i>n</i> -BuOH	251.11 ±1.01	135 ±45.96

Ces tableau est illustré dans l'histogramme représenté par la figure 21:

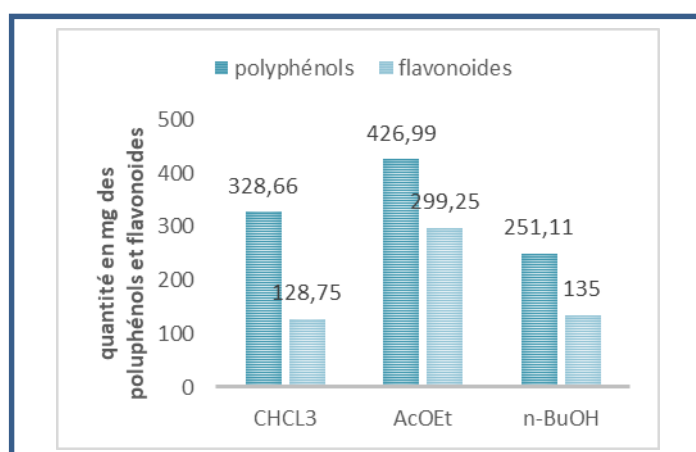


Figure 22: quantité en mg des polyphénols et des flavonoïdes dans CHCl₃, AcOEt et *n*- BuOH.

D'après les histogrammes de la figure, on note les observations suivantes :

➤ Les teneurs en polyphénols enregistré en équivalent d'acide gallique, sont plus importantes dans l'extrait AcOEt (426.99 mg EAG/mg d'extrait) que dans l'extrait CHCl₃ (328.66 mg EAG/mg d'extrait) et l'extrait *n*-BuOH (251.11 mg EAG/mg d'extrait) De même, les teneurs en flavonoïdes, enregistré en équivalent de quercétine, sont plus fortes dans l'extrait AcOEt (299.25mg EQ/mg d'extrait) que dans l'extrait *n*-BuOH (135mg EQ/mg d'extrait) et l'extrait CHCl₃ (128.75mg EQ/mg d'extrait).

Cette teneur relativement élevée en polyphénols et en flavonoïdes dans AcOEt indique une richesse de ce dernier beaucoup plus important comparativement à l'extrait *n*BuOH et CHCl₃.

5. Activités antioxydants

L'activité antioxydante de l'extrait chloroformique et acétate d'éthyle et l'extrait t *n*-butanol à été testée par 3 méthodes : radical libre DPPH, ABTS, et FRAP

Préparation des solutions (extrait CHCl₃, AcOEt et *n*- BuOH) à partir de chaque extrait, sont préparées 7 solutions de concentration différants à partir d'une solution mère à 4 mg d'extrait solubilisés dans 1 mL de MeOH (Tableau 16).

Tableau 20: préparation des solutions.

Solutions préparées	Numérotations des solutions	Concentration solution (µg/mL)	Concentration finale (µg/mL)
0.5 mg d'extrait + 1 mL MeOH	S1	500	100
Prélever 0.5 mL de (S1) + 0.5 mL MeOH	S2	250	50
Prélever 0.5 mL de (S2) + 0.5 mL MeOH	S3	125	25
Prélever 0.5 mL de (S3) + 0.5 mL MeOH	S4	62.5	12.5
Prélever 0.5 mL de (S4) + 0.5 mL MeOH	S5	31.25	6.25
Prélever 0.5 mL de (S5) + 0.5 mL MeOH	S5	15.62	3.125
Prélever 0.5 mL de (S6) + 0.5 mL MeOH	S6	7.812	1.5625

5.1. Effet scavenger du radical DPPH (Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl):

➤ Principe:

ce test consiste à réduire une solution alcoolique du radical DPPH (de couleur violette) en

présence de l'antioxydant donneur d'hydrogène (HA), conduisant à la formation de la forme non radicalaire DPPH-H. Au cours de la réaction, cette réduction s'accompagne d'un changement de couleur, du violet au jaune. (Molyneux, 2004)(Figure 22).

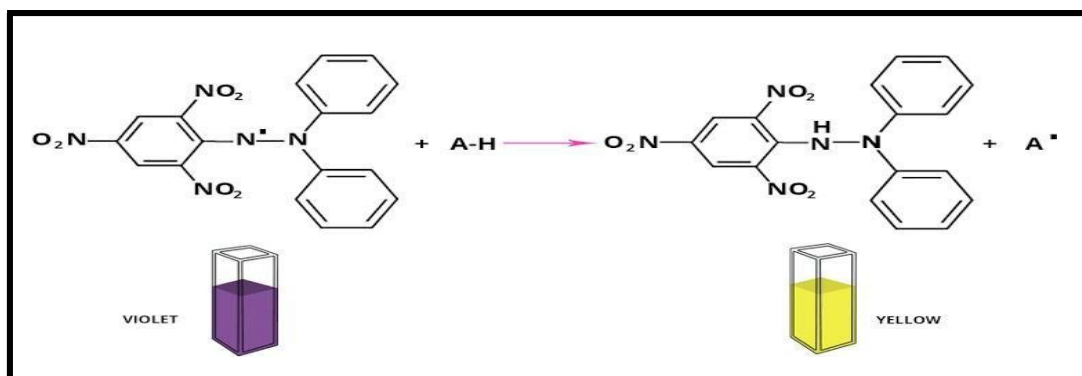


Figure 23: Structure chimique du radical libre DPPH.

➤ **Protocole expérimental :**

➤ **Préparation du DPPH :**

Dissoudre 1.5 mg de DPPH dans un volume de 25 mL de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (490 nm) dans le spectrophotomètre.

➤ **Procédure :**

Une prise de 40 uL d'extrait dilué méthanolique est mélangé avec 160 uL de DPPH, On laisse à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 minutes, On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 490 nm.

Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante:

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

- **I %:** Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).
- **Abs Échantillon :** Absorbance de l'échantillon.
- **Abs Contrôle :** Absorbance du contrôle négatif.

5.2. ABTS scavenging activity:

➤ Principe:

ABTS forme également un radical libre relativement stable, qui décolore sous sa forme nonradicalaire. Dans cette méthode, Ce radical est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium pour donner une solution colorée en vert bleu. Après une période de temps fixe le reste $ABTS \cdot +$ est quantifié par spectrophotométrie à 734 nm. Le spectrophotométrique analyse de l'activité de piégeage $ABTS \cdot +$ déterminé selon la méthode de Re et al. (Apak et al.,2004)

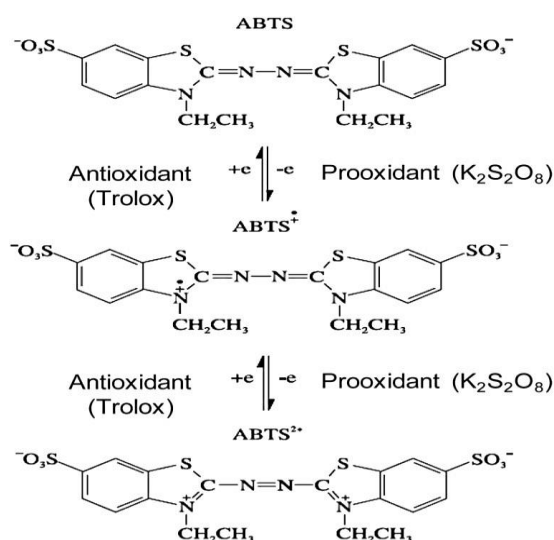


Figure 24: Formation du radical $ABTS^{\bullet+}$

Protocole expérimental :

➤ Préparation de l'ABTS :

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 3 mM de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ et une solution stock d'ABTS à 8 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 12 à 16 h avant utilisation. L'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm avant l'usage.

(ABTS+) → 19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 mL H₂O + 3,3 mg (2.45 mM) (K₂S₂O₈) + 5 mL H₂O +
Attendre 16 heure à l'abri de la lumière.

➤ **Procédure :**

Pour chaque échantillon, on dépose 40 µl d'extrait sur une microplaque à 96 puits. Ensuite, on ajoute 160 µl d'ABTS à chaque puits. En parallèle, on prépare un blanc de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol. On mélange 40 µl de méthanol avec 160 µl d'une solution méthanolique d'ABTS.

Après 10 minutes d'incubation, on mesure l'absorbance à 734 nm.

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

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = \frac{[(\text{Abs témoin} - \text{Abs blanc})]}{(\text{Abs témoin})} \times 100$$

- **Abs témoin :** l'absorbance de l'échantillon radical ABTS+ méthanol.
- **Abs blanc :** l'absorbance de ABTS radical + Extrait / standard.

5.3. Le test FRAP (pouvoir antioxydant réducteur ferrique).

➤ **Principe:**

Cette méthode permet de déterminer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans un complexe ferricyanure, tel que le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆, en fer ferreux (Fe²⁺). Par conséquent, le Fe²⁺ peut être quantifié en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm.. Incuber le mélange réactionnel dans l'obscurité pendant 20 minutes à 30°C et mesurer l'absorbance du mélange réactionnel à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ **Préparation des solutions:**

1. Acide trichloroacétique (TCA) à 10%: On dissout 1 g de TCA dans 10 ml d'eau distillée.
2. Potassium ferricyanure (K₃Fe(CN)₆) à 1%: On dissout 1 g de (K₃Fe(CN)₆) dans 100 ml d'eau distillée.
3. Chlorure de fer (FeCl₃) à 0,1%: On dissout 0,1 g de FeCl₃ dans 100 ml d'eau distillée.

➤ **Procédure**

La solution des extraits à différentes concentrations (10 µl) a été déposée dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Puis on ajoute 40 µl d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50 µL d'une solution de potassium ferricyani $K_3Fe(CN)_6$ (1%). Par la suite, les mélanges sont incubés à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 µL de TCA, 40 µL de H_2O et 10 µL de $FeCl_3$ sont rajoutés au milieu réactionnel.

Parallèlement, Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol. Les absorbances ont été mesurées à 700 nm et les résultats ont été calculés comme $A_{0,5}$ (concentration en µg/ml correspondante à l'absorbance à 0,50 nm)

6. Discussion des résultats :

➤ La capacité antioxydante de nos extraits $CHCl_3$, AcOEt, *n*-BuOH a été déterminée à partir des

CI₅₀ et A_{0,5}. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% des radicaux : DPPH, ABTS, et FRAP. La **CI₅₀** et l'activité antioxydante des extraits testés sont inversement proportionnelles.

➤ Nous avons calculé les **CI₅₀** pour les trois extraits $CHCl_3$, AcOEt, *n*-BuOH à partir de l'équation exponentiel de la courbe tracée. les valeurs des **CI₅₀** sont représentées dans le (Tableau 17).

➤ Tous nos extraits ont présentés un pouvoir antioxydant comparativement avec celui de BHT utilisé comme standard, ce qui est confirmé par les bibliographies que, généralement, les polyphénols naturels sont des piègeurs puissants de radicaux libres.

➤ D'après l'histogramme, nous remarquons en premier lieu que nos trois extraits ont une activité antioxydante moins prononcé que la substance BHT.

➤ En second lieu, l'extrait AcOEt et l'extrait *n*-BuOH montrent une activité antioxydante plus importante par rapport à l'extrait $CHCl_3$ de plus, l'extrait AcOEt montre une activité plus importante que l'extrait *n*-BuOH, cette différence expliquée par le fait que l'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leurs structures individuelles et de leurs taux dans l'extrait.

Donc concernant nos échantillons, nous pouvons les classer selon l'ordre décroissant d'activité Antioxydante comme suit :

BHT > l'extrait AcOEt > l'extrait *n*-BuOH > l'extrait $CHCl_3$

Tableau 21: Activité antioxydante par les tests DPPH, ABTS et FRAP.

	Extraits	Concentration (µg)										
		1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	CI50/A _{0.5} µg/mL
DPPH	CHCl₃	Nt	Nt	Nt	8.29± 6.85	15.48± 3.72	27.09± 5.99	45.94± 2.60	70.00± 5.70	78.60± 2.89	73.13± 1.08	118.45± 0.28
	AcOEt	Nt	20.17± 2.92	31.94± 2.78	49.12 0.86	79.14 0.63	87.97 0.00	89.06 0.87	88.91± 1.18	NT	NT	11.94± 1.92
	n-BuOH	Nt	Nt	Nt	24.85± 4.20	39.85± 0.00	59.74± 0.36	84.43± 1.97	89.32± 0.33	89.22± 0.72	88.07± 1.73	42.80± 4.42
	BHT	47.77 1.22	56.93± 1.84	72.83± 1.23	78.46± 1.01	79.48± 0.31	80.03± 1.62	80.10 ± 0.66	Nt	Nt	Nt	6.82±0 .49
	BHT	47.77 1.22	56.93± 1.84	72.83± 1.23	78.46± 1.01	79.48± 0.31	80.03± 1.62	80.10 ± 0.66	Nt	Nt	Nt	6.82±0 .49
ABTS	CHCl₃	Nt	Nt	Nt	34.56± 1.29	41.98± 0.41	54.80± 2.50	77.92± 1.68	87.91± 0.80	88.63± 1.01	86.47± 1.31	41.18± 1.91
	AcOEt	Nt	30.42± 2.39	48.55± 1.23	67.28± 0.39	90.14± 0.86	91.06± 0.23	91.79± 0.11	91.66± 0.30	Nt	Nt	5.95± 0.45
	n-BuOH	Nt	Nt	Nt	37.58± 1.82	49.01± 0.80	76.74± 0.52	64.26± 44.67	91.66± 0.69	91.79± 0.30	91.72± 0.20	24.94± 0.66
	BHT	49.22± 0.75	59.22± 0.59	78.55± 3.43	90.36± 0.00	92.18± 1.27	93.37± 0.86	94.87± 0.87	Nt	Nt	Nt	1.59± 0.03
FRAP	CHCl₃	Nt	Nt	Nt	0.14± 0.00	0.17± 0.02	0.20± 0.00	0.24± 0.01	0.42± 0.19	0.37± 0.10	0.64± 0.10	276.33± 99.88
	AcOEt	Nt	0.27± 0.01	0.34± 0.01	0.50± 0.02	0.78± 0.09	1.11± 0.07	1.53± 0.12	2.47± 0.15	Nt	Nt	13.48± 0.96
	n-BuOH	Nt	Nt	Nt	0.15± 0.00	0.22± 0.03	0.31± 0.02	0.41± 0.01	0.63± 0.03	1.03± 0.09	1.90± 0.43	13.76± 0.02
	BHT	Nt	0.07± 0.00	0.09± 0.01	0.12± 0.01	0.17± 0.01	0.25± 0.02	0.47± 0.03	0.79± 0.09	Nt	Nt	3.62± 0.29

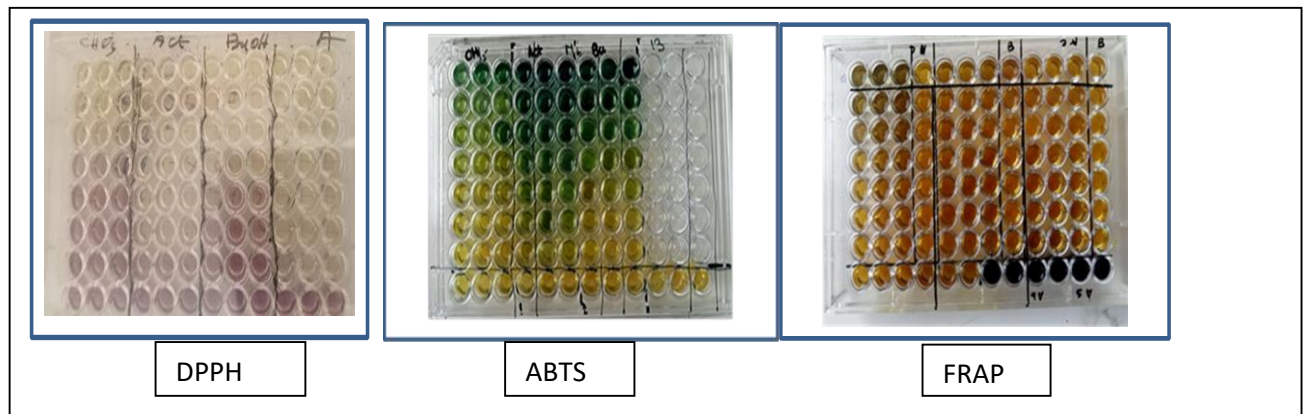
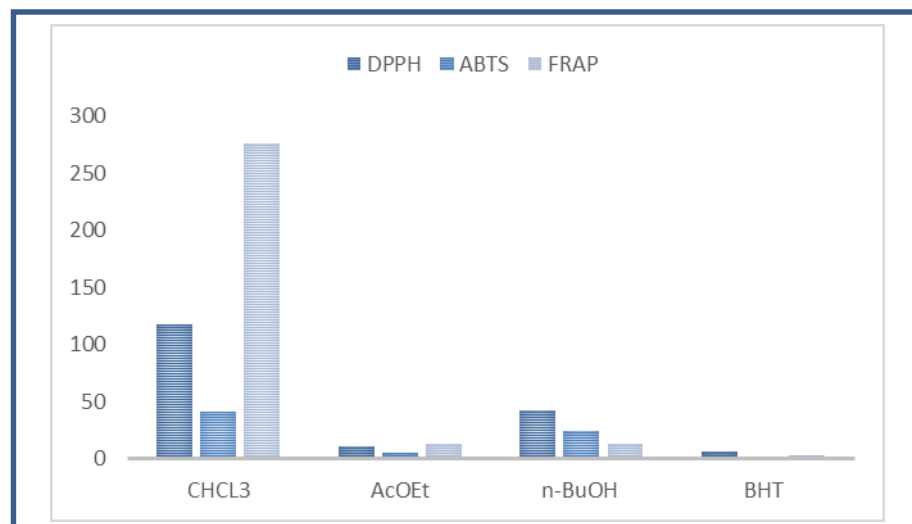


Figure 25 : Microplaque des tests: DPPH, ABTS, CUPRAC.



-Figure 26: Résultats de % d'inhibition de: DPPH, ABTS et FRAP des extraites CHCl₃, AcOEt et de l'extrait *n*-BuOH

Conclusion générale

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes à partir d'une plante de la famille Astéracée, récoltée de la région de Tamnrasate, dans le cadre de recherche sur les plantes médicinales d'origine algérienne afin de découvrir l'intérêt biologique de ces dernières et valoriser l'importance de la flore de notre pays.

Nous sommes intéressées aux flavonoïdes à cause de profil CLHP et CCM de l'extrait AcOEt qui a montré la richesse de ce dernier aux flavonoïdes.

L'étude phytochimique de cette plante nous a permis de séparer 2 flavonoïdes, en utilisant différentes techniques d'extraction, séparation et de purifications basées sur la combinaison de méthodes chromatographiques (CCM, CC et CLHP).

D'autres part, la détermination structurale définitive des flavonoïdes isolés a été réalisée grâce à l'utilisation des méthodes physico-chimiques et spectrales (R_f , fluorescence, UV-Visible, RMN¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC), il s'agit de :

- ✓ **Dihydrokaempférol**
- ✓ **Quercétine 3-O- β -D-galactopyranoside**

Enfin, des tests de dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante de la plante en utilisant différentes méthodes (DPPH, ABTS, FRAP). Ces dernières ont montré que notre plante est riche en polyphénols et flavonoïdes et que son pouvoir anti radicalaire est surtout prononcé dans l'extrait AcOEt.

Références bibliograph

Références

- A.M., R., Hammouda, F., Ismail, S., & Hussiney, H. (1993). Constituents of plants growing in Qatar XXIII: Flavonoids of *Francoeuria crispa*. Qatar University Science Journal, 13, [pages non précisées].
- Abd Elchakour, A. S. (1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda.
- Ammar, S., Noui, H., Djamel, S., et al. (2020). Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides. Environmental Science and Pollution Research, 27, 26594–265604.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7970-7981.
- Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Zygophyllum cornutum* (Mémoire de Magister, Université — Département de chimie organique).. B. Harborn, Chapman and Hall, London, pp: 617-652.
- Baker, J. T., Borris, R. P., Carté, B., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., Cragg, G. M., Gupta, M. P., Iwu, M. M., Madulid, D. R., and Tyler, V. E. (1995). Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration, Journal of Natural Products 58, 1325-1357.
- Barkley, T. M., Brouillet, L., & Strother, J. L. (2006). Flora of North America: Asteraceae (Vol. 19, pp. 3–69). Oxford University Press. Dupont
- Belbache, H. (2003). Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea parviflora* Desf. (Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, Département de chimie organique).
- Bonnier., G. (1934). Flore complète de France, Suisse et Belgique. Édition 10. p 118.
- Botineau, M., & Pelt, J.-M., (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. France : Lavoisier.

- Boullard, B., (1997). Dictionnaire : Plantes et champignons (p. 202). Éditions Belin.
- Boumaraf, M., Mekkiou, R., Benyahia, S., Chalchat, J. C., Chalard, P., Benayache,
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M., and Ayachi, A. (2011) Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne, *Lebanese Science Journal* 12, 59- 69.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3e éd.). Paris : Éditions TEC & DOC.
- Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., and Benedetti, S. (2006) Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family, *Food chemistry* 97, 725-731.
- Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., and Benedetti, S. (2006) Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family, *Food chemistry* 97, 725-731.
- Crete., P. (1965). Précis de botanique. Masson, Paris. Édition 2. p 429.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In A. Crozier, M. N. Clifford, & H. Ashihara (Eds.), *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet* (pp. 1–24). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Dekinash, M. F., Abou-Hashem, M. M., Beltagy, A. M., & El-Fiky, F. K. (2019). GC/MS profiling, in-vitro cytotoxic and antioxidant potential of the essential oil of *Pulicaria crispa* (Forssk) growing in Egypt. *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine*, 3(3), 1–7.
- El Ouali, I., Hammouti, B., Aouniti, A., Ramli, Y., Azougagh, M., Essassi, E., and Bouachrine, M. (2010). Thermodynamic characterisation of steel corrosion in HCl in the presence of 2-phenylthieno (3, 2-b) quinoxaline, *Journal of Materials and Environmental Science* 1, 1-8.
- El-Negoumy, S. I., Mansour, R. M., & Saleh, N. A. (1982). Flavonols of *Pulicaria arabica*. *Phytochemistry*, 21(4), 953–954.
- El-Sabagh, O. A., El-Toumy, S., Mounir, R., Farag, M. A., & Mahrous, E. A. (2021). Metabolite profiles of *Pulicaria crispa* and *P. incisa* in relation to their in-vitro/in-vivo antioxidant activity and hepatoprotective effect: A comparative mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113804.
- Ezoubeiri, A., Gadhi, C. A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., & Vanhaelen, M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 287–292.

- F., & Benayache, S. (2016). Essential oil composition of *Pulicaria undulata* (L.) DC. (Asteraceae) growing in Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(5), 746–749.
- F., & Pguignard, J., (2007). *Botanique systématique moléculaire* (14e éd., p. 248).
- Fahn, A. (1988). Tansley review no. 14: Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(2), 229–257.
- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Bayer, R. J. (Eds.). (2009). *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy
- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Robinson, H. Classification of Compositae. In V. A. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy, & R. J. Bayer (Eds.), *Systematics, evolution, and biogeography of Composite* (pp. 171–189). International Association for Plant Taxonomy.
- Guignard, J.-L. (1994). *Abrégé de botanique* (9e éd., pp. 203–204). Masson.
- Hafez, E. S. E. (1987). *Reproduction in farm animals* (5e éd.). Lea & Febiger.
- Hanbali, E. L., Akssira, M., Ezoubeiri, A., Gadhi, C. E. A., Mellouki, F., Benherraef, A., Blazquez, A. M., & Boira, H. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 399–401.
- Harborne J. B. (1988). *The flavonoids, Advances in research since 1980*. Chapman & Hall. London.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, London.
- Hesham, S., Abd El Ghany, M., & Systems, D. (2016). Survey on real-time networks-on-chip. *IEEE Transactions on Parallel and Distributed Systems*, 28(5), 1500–1517.
- Jurd, L., Horowitz, R. (1962). *Spectral properties of flavonoid compounds*, pergamon press, Oxford, 107, 2055.
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., & Dostálek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1063–1090.
- Khenaka, K., (2011). *Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogenèse ruminale chez l'ovin* (Mémoire de Magister, Université - Département de microbiologie appliquée).
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., and Pihlaja, K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5338–5342.

- Kujala, T. S., Lopenen, J. M., Klika, K. D., and Pihlaja, K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5338-5342.
- L.-L. i, Yang, J.-L., & Shi, Y.-P. (2010). Phytochemicals and biological activities of *Pulicaria* species. *Chemistry & Biodiversity*, 7(1), 327-349
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Carde J.P. (1994). *Biogenèse des monoterpènes*. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 133, 69–118.
- Loupy, A. (2006). *Microwaves in organic synthesis* (2e éd., Vols. I & II). Wiley-VCH.
- Malecky, M. (2005). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* (Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech). AgroParisTech.
- Marc, T., Gerard, W., and Denis, L. (2001). Classification des anti-inflammatoires in *Guide pharmacologie, Etudiants et professionnels paramédicaux*. 4ème Edition. P 426.
- Markham, K. R. (1982). *Technique of flavonoids identification*, Academic press, London.
- Middelton, Jr. E., Kadasnami, C. (1993). *The flavonoids, advances in research since 1986*.ed. J.
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. sci. technol* 26, 211-219
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. sci. technol* 26, 211-219.
- Mothana, R. A., Linde, D., & Younis, M. (2009). Antioxidant, antimicrobial, antileukemic, antispasmodic, anticancer, and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants in Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2), 373–379.
- Nickavar, B., Mojab, F., & Javidnia, K. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(9– 10), 629–631..(29)
- Panero, J. L., Funk, V. A. (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics*. 47: 757-782.
- Pares, J. O., Oksuz, S., Ulubelen, A., & Mabry, T. (1981). 6-Hydroxyflavonoids from *Pulicaria dysenterica* (Compositae). *Phytochemistry*, 20(8), 2057.
- Popovici, C., Saykova, I., and Tylkowski, B. (2010) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Popovici, C., Saykova, I., and Tylkowski, B. (2010) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.

- Quézel, P., & Santa, S. (1962–1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions(1): Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M., and Ayachi, A. (2011) Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne, *Lebanese Science Journal*12, 59- 69.
- Quézel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol. 1). Éditions du CNRS.
- Rahili, G. (2002). Les huiles essentielles et leurs intérêts. *La Forêt Algérienne*, (4). Institut National de la Recherche Forestière.
- Rahman, M. A., Islam, M. S., & Biswas, M. (2014). Asteraceae family: A potential source of anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), 89–92.
- Ramadan, M. A. (1998). Flavonoids from *Pulicaria arabica* (L.) Cass. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences, Assiut*, 21(2), 103–108.
- Rizk, A.-F. M., & Shams, I. (1982). Flavonoids of *Francoeuria crispa*. *Planta Medica*, 45(07), 146.
- Rodriguez, J., Smith, M. T., & Thompson, R. (1976). Studies on the antimicrobial properties of plant extracts. *Journal of Medicinal Plants*, 15(4), 122–130.
- Sassoui, A., Sarri, D., Hendel, N., & Sarri, M. (2022). Traditional uses, phytochemical and biological activities of *Pulicaria arabica* (L.) Cass. *Journal of EcoAgriTourism*, 18(1), 30–35.
- Silvant, C. (2015) *L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité*, Editions Publibook
- Spichiger, R.-E., Figeat-Hug, M., and Jeanmonod, D. (2002) *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*, PPUR presses polytechniques. 3eme Ed.press polytechniques et universitaire romandes Lausanne, Suisse, p.328.
- Stavri, M., Gibbons, S., & Stewart, D. (2008). Antimicrobial and cytotoxic activity of selected natural products. *Phytotherapy Research*, 22(5), 610–614.
- Stavri, M., Mathew, K., Gordon, A., Shnyder, S., Falconer, R., & Gibbons, S. (2008). Biological activity of naturally occurring and synthetic flavonoids against *Clostridium difficile*. *Phytochemistry*, 69(9), 1915–1920.
- Stevens, P. F. (2008). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9.
- Sumonrat, C., Suphitchaya, C., & Tipparat, H. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin. J Sci Technol*, 30(1), 125-131.

- Tenscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : Épices, aromates, condiments et huiles essentielles (pp. 3–50, 121–124). Tec & Doc.
- Touati, N., Casas, L., Mantell, C., Martínez de la Ossa, E., & Bedjou, F. (2014). Green extraction methods of antioxidants from *Pulicaria odora*. Communication présentée au GPE – 4th International Congress on Green Process Engineering, 7–10 avril 2014, Séville, Espagne
- Usher, G. (1966). A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science, and statistics. Constable & Co. Ltd.
- Voirin, B. (1983). *Phytochemistry*, 22 (10), 2107-2145.
- Williams, C. A., Harborne, J. B., & Greenham, J. (2000). Geographical variation in the surface flavonoids of *Pulicaria dysenterica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(7), 679–687.
- Williams, C. A., Harborne, J. B., Greenham, J. R., Grayer, R. J., Kite, G. C., & Eagles, J. (2003). Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry*, 64(1), 275–283.
- Williams, J. T., Smith, L. A., & Brown, P. R. (2000). The therapeutic potential of plant extracts. *Journal of Phytotherapy Research*, 14(3), 212–218.
- Wilson, R. G., Bowie J. H., Williams D. H, (1986), *Tetrahedron*, 24, 1407.

Summary

The objective of this work was to identify the flavonoids of a species of the genus *Pulicaria* belonging to the family Asteraceae collected in the region of Tamnrasate.

Our phytochemical investigations focused on the AcOEt extract. The isolation and the purification were carried out by the use of different chromatographic separation techniques (TLC, CC and HPLC). Two isolated flavonoids were identified by the use of physicochemical and spectral methods (R_f , fluorescence, UV-Visible, RMN^1H , ^{13}C , COSY, HSQC et HMBC).

The AcOEt extract showed a higher antioxidant activity using the methods of DPPH, ABTS and FRAP; this was confirmed by the determination of total polyphenols and flavonoids which revealed a greater richness of the extract AcOEt.

Key words: Asteraceae, *Pulicaria*, flavonoids, antioxidant activity, polyphenols and flavonoids contents.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تحديد المركبات الفلافونيدات لنبته تنتمي إلى الجنس " *Pulicaria* " و العائلة " Asteraceae " و التي تم قطفها من ضواحي مدينة تامنراست.

تمحورت أبحاثنا الكيميائية على المستخلص (AcOEt) ، حيث اعتمدنا في عمليات الفصل و التنقية على تقنيات كروماتوغرافية مختلفة مثل : الكروماتوغرافي العمود (CC)، الكروماتوغرافي الطبقة الرقيقة (CCM) و كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC) و من خلال المعلومات المتحصل عليها باستعمال مختلف طرق التحليل الفيزيوكيميائي و الطيفي (مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين المغناطيسي للبروتون أحادي و ثنائي البعد) تمكنا من عزل و تحديد بنية 2 مركبات فلافونيدية .

اظهر مستخلص (AcOEt) نشاطا مضادا للأكسدة بشكل أفضل باستخدام طرق DPPH، ABTS و FRAP ، وقد تم تأكيد ذلك من خلال تحديد قيمة المركبات البوليفينولة و الفلافونويدية باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu و طريقة Topcu التي كشفت عن مدى غنى المستخلص (AcOEt) بهذه المركبات.

الكلمات المفتاحية: Asteraceae ، *Pulicaria* المركبات الفلافونويدية ، نشاط مضاد للأكسدة ، معايرة البوليفينول ، معايرة الفلافونويد.

Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'identifier les composés flavonoïdiques d'une plante appartenant au genre Pulicaria et à la famille des Asteraceae, récoltée dans les environs de la ville de Tamanrasset.

Nos recherches chimiques se sont focalisées sur l'extrait à l'acétate d'éthyle (AcOEt), en utilisant différentes techniques chromatographiques pour les étapes de séparation et de purification, telles que la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Grâce aux données obtenues par diverses méthodes d'analyse physico-chimiques et spectroscopiques (spectroscopie UV et résonance magnétique nucléaire du proton unidimensionnelle et bidimensionnelle), nous avons pu isoler et élucider la structure de deux composés flavonoïdiques.

L'extrait à l'acétate d'éthyle (AcOEt) a montré une activité antioxydante marquée, évaluée par les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. Ce potentiel antioxydant a été confirmé par la détermination de la teneur en composés polyphénoliques et flavonoïdiques, respectivement par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode de Topcu, révélant la richesse de cet extrait en ces composés bioactifs.

Mots-clés : *Asteraceae, Pulicaria, composés flavonoïdiques, activité antioxydante, dosage des polyphénols, dosage des flavonoïdes.*