



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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 Moléculaire et Santé

Intitulé :

Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea parviflora* Desf.

Présenté et soutenu par : CHOUH AMINA

Le : 17/06/2015

CHAOUA DJAMEL

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : BOUTAGHANE NAIMA (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : BELBACHE HANENE (MAA- UFM Constantine).

Examineur : AYAD RADIA (MCB- UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015



*Avant tout, nous remercions Dieu
tout puissant de nous avoir donné la
force, le courage, la persistance et
nous a permis d'exploiter les moyens
disponibles à fin d'accomplir ce
modeste travail.*

*Merci de nous avoir éclairé le chemin
de la réussite.*





Remerciements

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Mme **BELBACHE.H** maitre assistante classe A, Université des Frères Mentouri Constantine, qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé nous ont permet de réaliser ce travail.

Nous remercions Mme **BOUTAGHANE.N** maitre de conférence classe B, Université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Mme **AYAD.R** maitre de conférence classe B, Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté d'examiner notre travail et de nous avoir aidé pendant notre travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à Mlle **KLIBAT FAHIMA** maitre assistante, Université des Frères Mentouri Constantine pour ses conseils objectifs et éclairés.

Un grand merci au personnel du laboratoire de biochimie, et particulièrement Mr **BOUDERSA Nabil** et Mme **BIBECH ZAHRA**.

Nous remercions aussi tous les membres de la bibliothèque de Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et du département de chimie, Université des Frères Mentouri Constantine en particulier Monsieur **BOULEMDAIS ABD EL MALEK**
Pour leur gentillesse et leur aide.

Dédicace

Je dédie ce travail à Ma famille

À ma très chère mère

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À ma sœur : aucun mot ne saurait exprimer tout l'amour que je vous porte.

À mes oncles, mes tantes

À mes cousins/es : Khaled, zaki, batoul, Radia, Asma, soumia.

À mes meilleurs amis: NABIL B, ZINOU M, Sarah Kehal, Nour, Amine, Rayene, Malika, Sara B qui n'ont jamais cessé de croire source de courage

*À mes amis: Khadidja, Amina, wafaa, Yacin, Nazim, Maya boukahil, Amira, Imen, mimouna, Meriem, Nabil, Randa, Ahlem, Ulia, Idrissa, Khaoula, Nedjla, hichem, Bouthaina, a
Tous ceux qui ont connus.*

*À La promotion de Master 2 biochimie Moléculaire et santé
LMD*

AMINA.

Dédicace

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents, source d'amour, de patience et de sacrifice.

À mes frères : SOFIANE, MAHDI, HAMZA ISKANDER, LAMINE.

À mes adorables sœurs : DALEL, SELMA.

À Notre ange : ANES MOHAMED SADJED.

À mes amies proches: HAMOU, IMED, ADEM

À mes amies particulièrement IMEN, mon source de courage. YACINE, MOUNAAME, OUSSAMA, FAROUK, AZIZ, HOCINE, NAAIME, ZAKI, NABIL.

Que dieu me les gardent et m'aide à leurs offrir ce que toujours souhaité

À toute la promotion de master 2 biochimie moléculaire et cellulaire

DJAMEL.

Abréviation

IPP : isopentényl pyrophosphate.

ASP : acide aspartique.

CHCL₃ : Chloroforme.

EtOH : Ethanol.

MeOH : Méthanol.

BuOH : Butanol.

AcOEt : Acétate d'éthyle.

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium anhydre

FeCl₃ : chlorure ferrique.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

FCR : Folin-Ciocalteu.

SM : Solution mère.

¹H : Spectre du proton.

CDCl₃ : Chloroforme deutéré.

d : Doublet.

dd : Doublet de doublets.

***J*(Hz)** : Constante de couplage exprimée en Hertz.

ppm: Partie par million.

Liste des figures

Figure 1 : carte géographique des plantes dans l'algerie.....	1
Figure 2 : squelette de base des flavonoïdes.....	6
Figure 3 : La biosynthèse des flavonoïdes.	7
Figure 4 : Squelette de base des terpènes.....	9
Figure 5 : la synthèse de l'isopenténylpyrophosphate (IPP).....	10
Figure 6 : la synthèse des différentes classes des terpènes.....	10
Figure 7 : Structure de quelques monoterpènes et leur source	11
Figure 8 : Structure de quelques Sesquiterpène	11
Figure 9 : Structure de quelques diterpenes.....	12
Figure 10 : Structure de quelques triterpènes.....	12
Figure 11 : Structure de quelques tétraterpènes	13
Figure 12 : Structure de caoutchouc.....	13
Figure 13 : Exemples d'alcaloïdes vrais.....	14
Figure 14 : Exemples de Pseudo-alcaloïdes	15
Figure 15 : Exemples de Proto-alcaloïdes	15
Figure 16 : La biosynthèse de la nicotine (alcaloïde vrais)	15
Figure 17 : La biosynthèse de la conine (Pseudo-alcaloïdes).	15
Figure 18 : Schéma d'une plaque CCM.....	18
Figure 19 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique	19
Figure 20 : Structure acide gallique.....	22
Figure 21 : Structure de la quercétine.....	23
Figure 22 : la place systématique de <i>centaurea parviflora</i> Desf	25
Figure 23 : Organigramme d'extraction	31
Figure 24 : Plaque CCM de L'extrait chloroforme (Fleurs-Tiges)	32
Figure 25 : Plaque CCM de L'extrait Acétate d'éthyle (Fleurs-Tiges.....	33
Figure 26 : Plaque CCM de L'extrait n-butanol (Fleurs-Tiges)	33

Figure 27 : Protocole expérimentale de dosage des polyphénol.....	35
Figure 28 : Protocole expérimentale de dosage des flavonoïdes.	36
Figure 29 : Structure partielle du composé C.	40
Figure 30 : Les différents résultats de la série spectrale UV-visible.....	41
Figure 31 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	45
Figure 32 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.	46
Figure 33 : Teneur en flavonoïdes et en polyphénol dans les extraits préparé ...	46

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques.	5
Tableau 2 : Les différentes classes des flavonoïdes.....	8
Tableau 3 : Relation entre la fluorescence et la nature du produit flavonique.	17
Tableau 4 : Déplacement chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.	19
Tableau 5 : Déplacement chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.	19
Tableau 6 : Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes.	20
Tableau 7 : Les informations obtenues en présences des réactifs.	21
Tableau 8 : Les différents résultats de screening.	36
Tableau 9 : Résultats de la série spectrale UV-Visible.....	38
Tableau 10 : Les résultats de la spectroscopie RMN ¹ H.....	42

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux.

1-Introduction generale1

2-Partie bibliographique :

Chapitre I : les métabolites secondaires du genre Centaurea

I-1- Introduction3

I-2-les composés aromatiques ou phénoliques4

I-2-1- Généralités4

I-2-2- biosynthèse des composés phénoliques4

A / La voie de shikimate4

B/ la voie d'acétate malonate.....4

I-2- 3- Principales classes des composés phénoliques5

I-2-4-Les flavonoïdes6

1 - La biosynthèse des flavonoïdes6

2 - Les différentes classes des flavonoïdes7

3- Les propriétés des flavonoïdes8

I-3- Les Terpènes9

I-3-1- La biosynthèse des terpènes9

I-3-2- Les différentes classes des terpènes.....10

1- Monterpène10

2- Sesquiterpène	11
3- Diterpène	11
4- Triterpène	12
5- Tetraterpène	12
6- Polyterpène	13
I-3-3- Les propriétés des terpènes	13
I-4-Les alcaloïdes :	14
I-4-1-Les différentes classes des alcaloïdes :	14
A- Les alcaloïdes vrais	14
B - Les pseudo-alcaloïdes	14
C - Les proto-alcaloïdes	15
I-4-2-La Biosynthèse des alcaloïdes	15
I-4-3-Propriétés des alcaloïdes	16

Références bibliographiques

Chapitre II : Les méthodes d'analyses physico-chimiques

II-1-Le criblage phytochimiques (screening).....	17
II-2- L'étude phytochimiques des flavonoïdes	17
2-3-1- Chromatographie sur colonne (CC)	17
2-3-2- Chromatographie sur papier (CP)	17
2-3-3- Chromatographie sur couche mince (CCM)	17
II-3-Les technique d'identifications structurales des Flavonoïdes	18
II-3-1- La fluorescence sous lumière de Wood des flavonoïdes	18

II-3-2-Révélation	18
II-3-3-Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	19
II-3-4-Spectrophotométrie UV-visible	20
II-4- Etude quantitative	23
II-4-1-Dosage des polyphénols totaux	23
III-4-1-Dosage des flavonoïdes totaux	24

Références bibliographique

Chapitre III : Partie expérimentale

III-1-Place dans la systématique	25
III-2-Description de l'espèce parviflora.....	25
III-3-Etudes phytochimique de l'espèce centaurea parviflora desf.	27
III-3-1-Le produit végétal	27
III-3-2-Le Screening phytochimique.....	27
III-3-3-1-Recherche des alcaloïdes	27
III-3-3-2-Recherche des coumarines	27
III-3-3-3-Recherche des substances polyphénoliques (tanins)....	28
III-3-3-4-Recherche des triterpènes, stérols et terpènes	28
III-3-3-5-Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes.....	29
III-3-3-6-Recherche des saponines.....	29
III-3-3-7-Recherche des anthocyanes.....	29
III-3-3-8-Recherche des quinones.....	30
III-3-2-Extraction par macération	32
1- L'extrait chloroforme (Fleurs-Tiges):	32

2- L'extrait Acétate d'éthyle (Fleurs-Tiges):	33
3- L'extrait n-butanol (Fleurs-Tiges):	33
IV-4-Quantification des polyphénols et des flavonoïdes.....	34
IV-4-1- Dosage des composés phénoliques totaux.....	34
IV-4-1- Dosage des flavonoïdes	35

Références bibliographiques

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV-1- Screening	36
IV-1-1 Conclusion et interprétation	38
IV-2- Identification du composé C	38
IV-2-1- La fluorescence	38
IV-2-2- Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation .	38
IV-3-3 Spectroscopie RMN ¹ H	41
IV -3-Quantification des composés phénoliques	44
IV-3-1 Dosage des phénols totaux	44
IV-3-2 Dosage des flavonoïdes	44
3-Conclusion générale	45
4- Résumé	
5- Sammuray	
6- ملخص	

Introduction générale

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands-parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres.

Actuellement l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [1]

L'Algérie possède un large éventail de plante médicinale grâce à sa situation biogéographique et climatique d'où la nécessité et l'importance de ce travail de recherche.

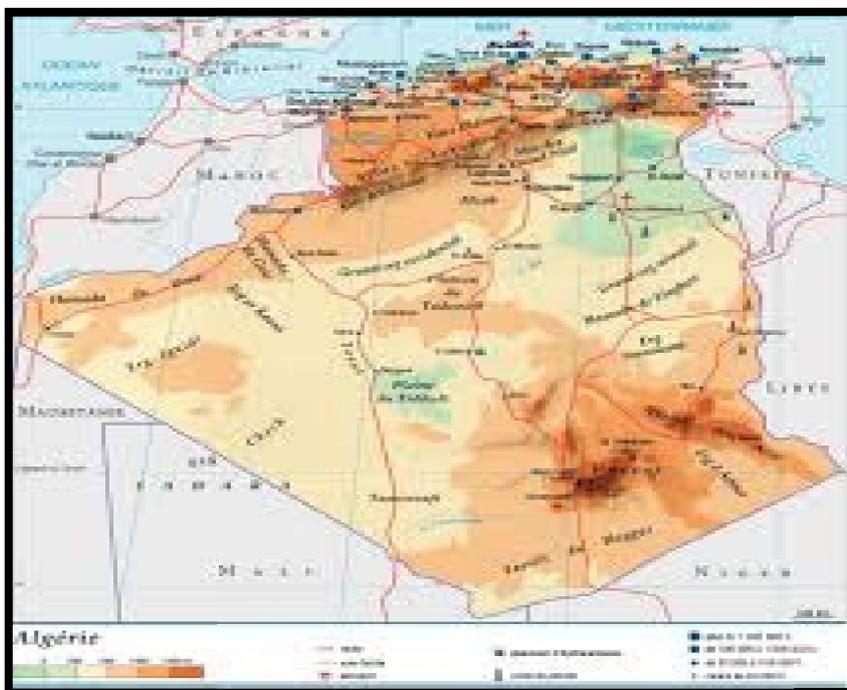


Figure 1: Carte géographique des plantes en Algérie

Dans le cadre de notre mémoire de master, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Centaurea parviflora* appartenant à la famille des Composées ducôtéphytochimique, en se basant sur ces compositions chimiques particulièrement riche en métabolites secondaires notamment les flavonoïdes.

Notre travail à caractère phytochimique est constitué de deux parties : une partie bibliographique comportant deux chapitres :

- Le premier est consacré aux principaux métabolites du genre *Centaurea*.
- Le deuxième renfermera un aperçu bibliographique sur les différentes méthodes d'analyses physico-chimiques.

Une deuxième partie représente notre travail personnel, elle est constituée également de deux chapitres :

- Le premier il comporte : Screening phytochimique, macération, extraction de la plante, teste des différentes phases obtenues sur plaques CCM, dosage totaux des polyphénols et flavonoïdes.
- Le deuxième reporte les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Notre mémoire est terminé par une conclusion générale qui résume en quelques lignes notre travail.

I-1-Introduction :

Les plantes et les animaux produisent une grande gamme impressionnante de diverses substances chimique. La plupart de ces produits sont basés sur le carbone ils sont connus sous le nom de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont communs pour toutes les espèces et peuvent être subdivisé aux protéines, lipides et acides nucléiques, les métabolites secondaires peuvent être subdivisés aux terpènes, shikimates, polyketides et alcaloïdes.

Cette classification est basée sur les moyens par lesquels sont synthétisé, les métabolites secondaires peuvent être communs ou spécifiques à une espèce donc les espèces qui ont le même modèle de production de métabolites secondaires peuvent être classés par leur métabolites c'est la taxonomie [1].

La famille des composées constituent la plus vaste subdivision du règne végétal. Cette famille comprend en effet 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [2].

Parmi les 1000 genres de cette famille le genre *Centaurea* qui compte environ 700 espèces et 600 sous-espèces [3]. Il est répandu aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent américain. Ce genre est présent en Algérie en majorité dans l'Est et le sud-Est dont les espèces sont sahariennes [4].

Dans notre travail nous nous sommes intéressé des métabolites secondaires du genre *Centaurea*, qui font un objet de plusieurs études et recherches phytochimiques qui ont révélé la présence des composées phénoliques notamment les flavonoïdes [5], de composés acétyléniques [6], de terpènes [7], d'alcaloïdes [8], et de stéroïdes [9].

I-2-les composés aromatiques ou phénoliques :

I-2-1- Généralités :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (signaux de reconnaissance entre les plantes, résistance, la tolérance des végétaux à des stress variés...) [10].

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques (C₆) portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH). Ces composés présentent une grande diversité de structures, ya a plus de 8000 structures phénoliques identifiées [11].

I-2-2- biosynthèse des composés phénoliques :

Ces composés sont issus par deux grandes voies biosynthétiques :

A / La voie de shikimate :

Appelée également la voie de phénylpropanoïde, c'est la voie principale dans la biogenèse du noyau aromatique emprunte l'acide shikimique (acide en C₆-C₁) lequel donne naissance à l'acide phénylpyravique puis à l'acide cinnamique (C₆-C₃) à partir de la phénylalanine [12].

B/ la voie d'acétate malonate:

Ce mode de formation plus secondaire consiste en la cyclisation des chaînes polycétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupement acétates. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl CoA en malonyl-CoA [12].

I-2- 3- Principales classes des composés phénoliques :

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques [13].

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques.

Nombre de C	Classe	Exemple/origine
C ₆	Phénols simples	Hydroquinon ,catechol
C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide salicylique
C ₆ -C ₃	Acide cinnamique	Acide cafféique, Acide férulique (café, pomme)
	Coumarines	Esculétine ,Scopolétine (Citron)
(C ₆ -C ₁) ₂	Lignanes	Pinornésol (Pin)
(C ₆ -C ₁) _n	Lignines	Bois, noyau des fruits.
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes Anthocyanes	Apigénine ,Lutéoline,quercétine (fruit)
		Génistéine(Soja)
		Pélargonidine,Cyanidine et delphinidine
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoïdes	Amentoflavone
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins	Propélargonidine , Procyanidine, Prodelphinidine (Raisin rouge)

I-2-4-Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C₆ reliés par une chaîne en C₃ [14]. Comme la figure 2 le montre :

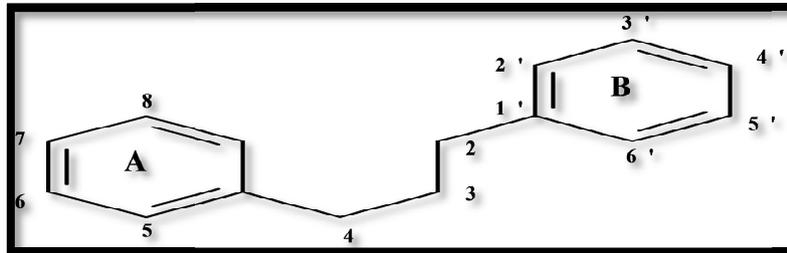


Figure 2 : squelette de base des flavonoïdes.

1 - La biosynthèse des flavonoïdes :

les flavonoïdes résultent de la condensation de 3 groupement acétate (fournis sous forme d'acétylCoA) avec l'acide 4'cinnamoyl-CoA, cette condensation conduit à la formation de 2 noyaux benzéniques A et B réunis par une chaîne de 3 atomes de carbones (hétérocycle C).

La chalconesynthase ou flavonesynthase assurant l'addition des unités malonates.

Leurs différentes modalités de synthèse à partir des chalcones(hydroxylation des noyaux aroamtiques, méthylation, degrés d'oxydation de la chaîne médiane) sont encore imparfaitement connues.la formation des iso flavonoïdes résulte d'une transposition secondaire du noya aromatique[12].La biosynthèse des flavonoïdes est résumée dans la figure 3, les enzymesqu'elle implique sont :

1. Chalcone synthèse
2. Polyketide réductase
3. Chalcone isomérase
4. 2-Hydroxyisoflavone synthase

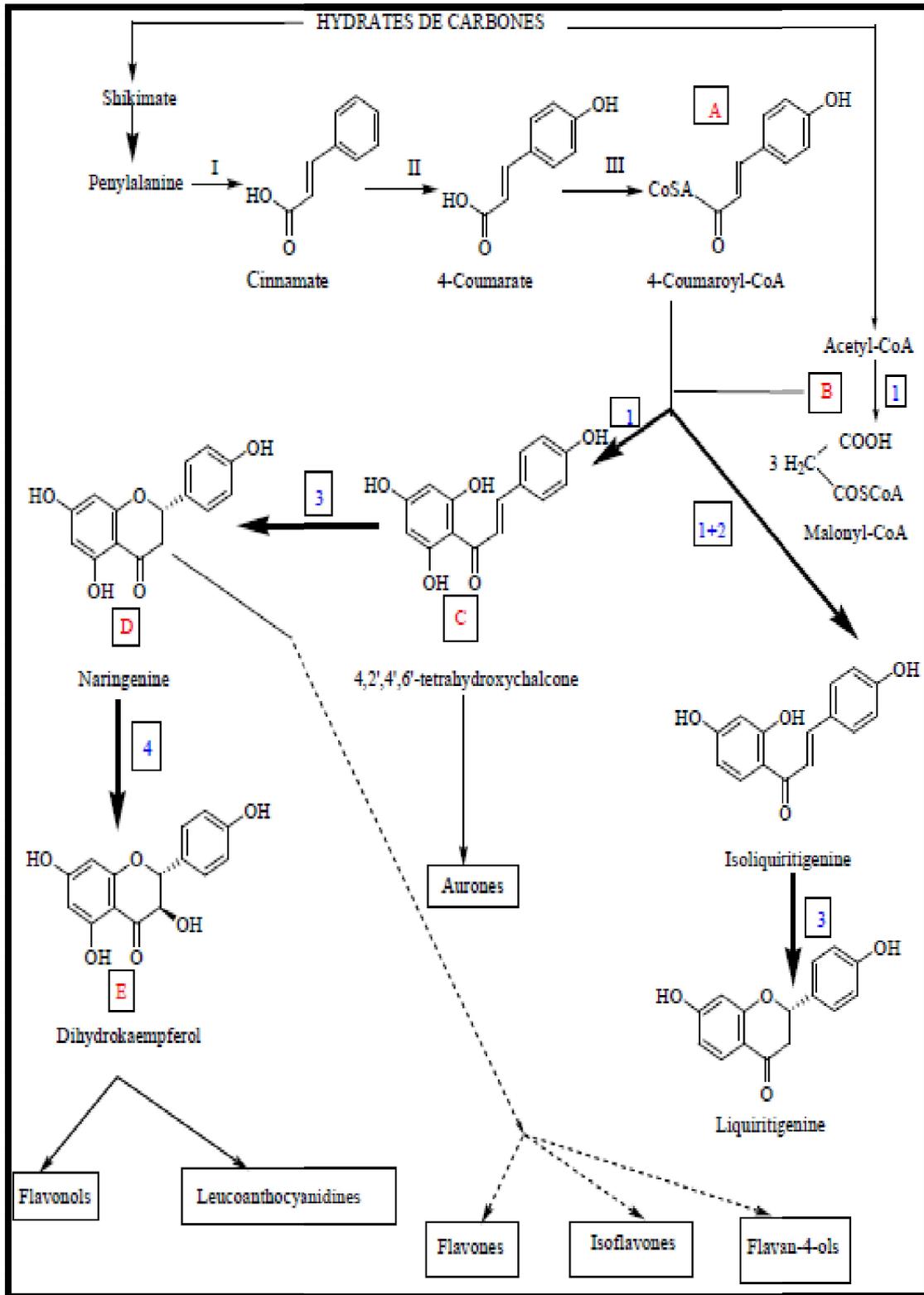


Figure 3 : La biosynthèse des flavonoïdes [15].

2 - Les différentes classes des flavonoïdes :

Le tableau 2 rapporte les différentes classes des flavonoïdes :

Tableau 2 : Les différentes classes des flavonoïdes [16].

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	<u>1</u> Apigénine
		OH	OH	H	<u>2</u> Lutéoline
		OH	OCH3	H	<u>3</u> Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	<u>4</u> Kaempférol
		OH	OH	H	<u>5</u> Quercétine
		OH	OH	OH	<u>6</u> Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	<u>7</u> Catéchine
Flavanones		H	OH	H	<u>8</u> Naringénine
		OH	OH	H	<u>9</u> Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	<u>10</u> Pelargonidine
		OH	OH	H	<u>11</u> Cyanidine
		H	OH	OH	<u>12</u> Delphénidine
Isflavones		OH	OH	OH	<u>13</u> Genisteine
		H	O-Glu	OH	<u>14</u> Daidezine

3- Les propriétés des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent des :

- Propriétés anti-inflammatoires [17].
- propriétés antivirales [18].
- Propriétés anti-cancérigènes [19].
- Propriétés antiradicalaires [20].
- Propriétés anti microbienne [21].
- Effet anti diabétogène et cytoprotecteur[22].
- propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres [23].

I-3- Les Terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques [24], ils constituent une ligne de recherche énorme du point de vue médical, chimique et génétique.

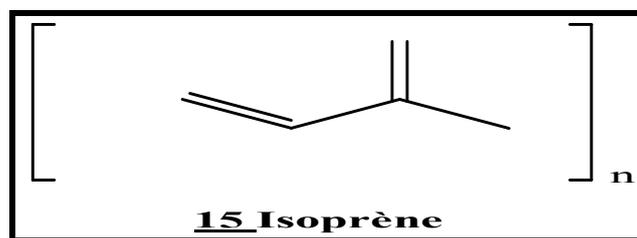


Figure 4 : Squelette de base des terpènes

I-3-1- La biosynthèse des terpènes :

Le véritable précurseur universel de tous les terpènes est l'acide Mévalonique qui se forme à partir de la condensation de trois unités acétates après réduction par le NADPH [25].

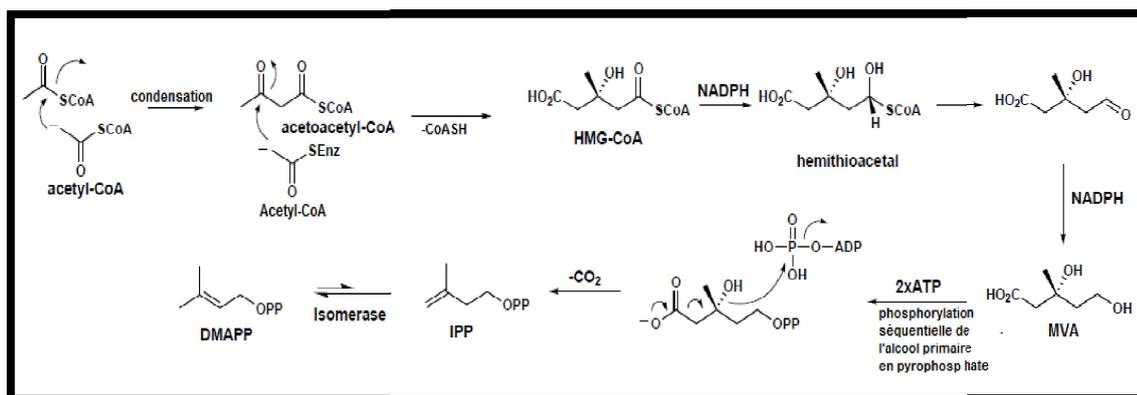


Figure 5 : la synthèse de l'isopenténylpyrophosphate (IPP)

L'addition de l'unité (IPP) avec son isomère forment le géranyl-diphosphate (C10), condensé avec une autre molécule IPP forment le diphosphate de farnésyl (C15) à l'origine de sesquiterpènes etc.

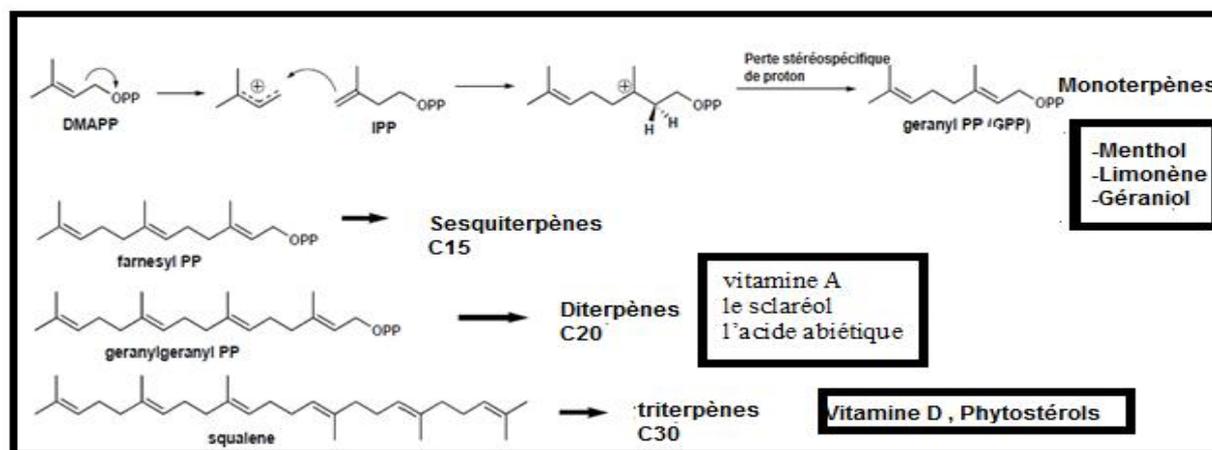


Figure 6 : la synthèse des différentes classes des terpènes

I-3-2- Les différentes classes des terpènes:

Selon le nombre d'entités isoprénique les terpènes sont classés en :

1- Monterpène :

À 10 atomes de carbone c'est des molécules légères, ils peuvent être linéaires ou monocyclique ou bicyclique[26]. Quelques exemples sont reportés dans la figure 7 :

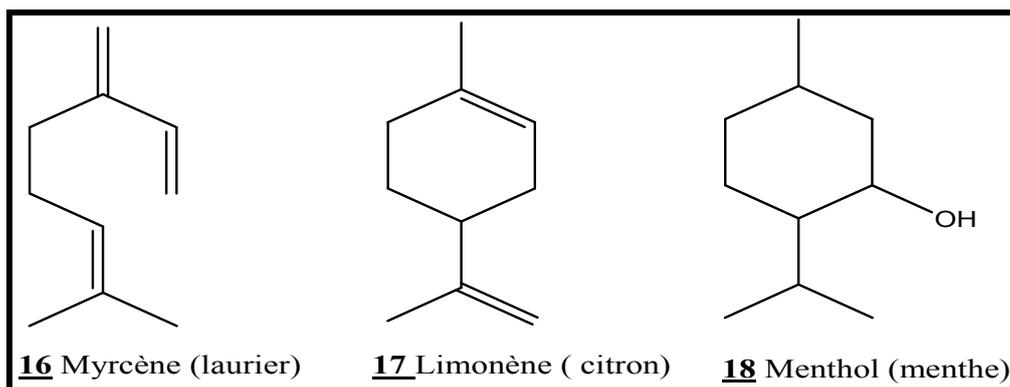


Figure 7: Structure de quelques monoterpènes et leur source

2- Sesquiterpène :

Une molécule de sesquiterpène est formée de 15 atomes de carbones, ils peuvent être Linéaire, Monocyclique, Tricyclique. Présente dans les huiles essentielles. Une large gamme de sesquiterpènes contiennent un cycle γ -lactone ils sont connus sous le nom des sesquiterpène lactones [27].

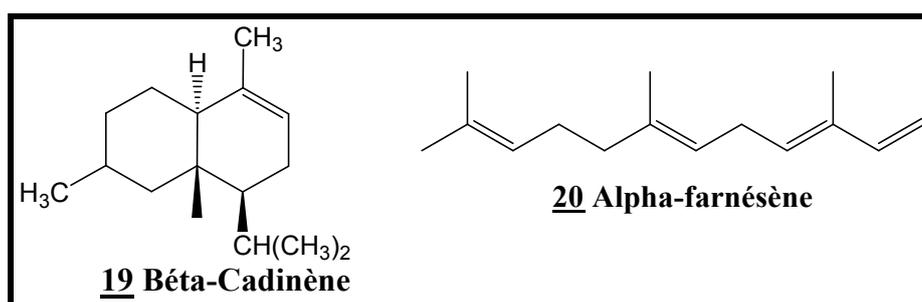


Figure 8: Structure de quelques Sesquiterpène

3- Diterpène :

Ayant un squelette principal formé de 20 atomes de carbones, Lesditerpènes sont très répandus et très variés de leurs structures, Les différentes classes des diterpènes sont distribuées selon l'ordre alphabétique de leur référence [28].

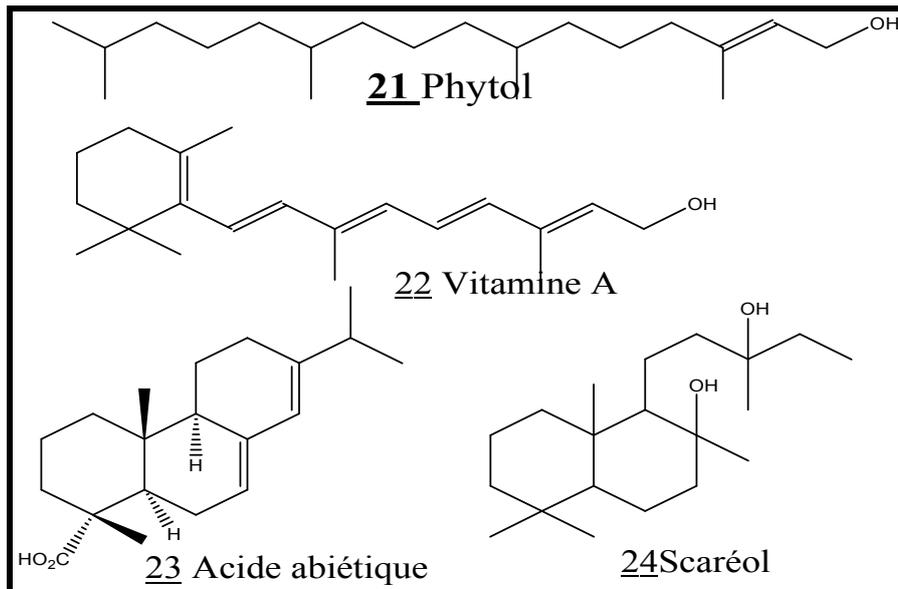


Figure 9: Structure de quelques diterpènes

4- Triterpène :

Ils sont très répandus dans la nature, formés de 30 atomes de carbones. La plupart des triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les stérols (cholestérol, squalène...) sont des dérivés de triterpènes.

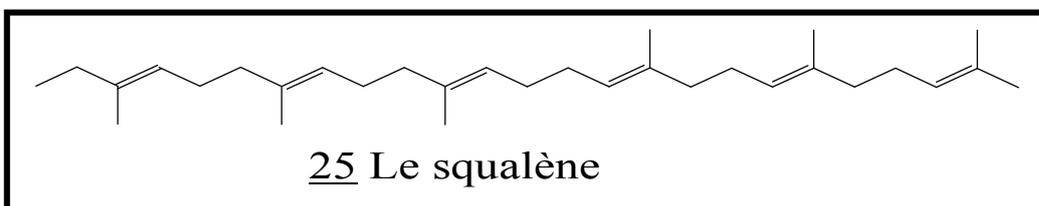


Figure 10: Structure de quelques triterpènes

5- Tetraterpène :

Ces molécules possèdent 40 atomes de carbones, Les plus répandus sont les caroténoïdes. Ces pigments sont caractéristiques des fruits (tomates, abricots...), des graines (maïs), des racines (carottes...).

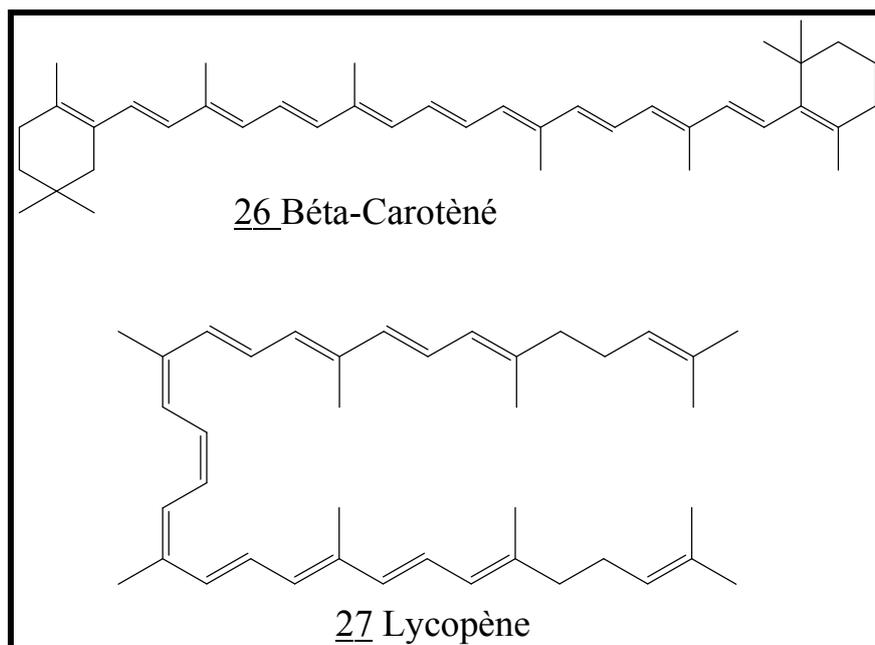


Figure 11: Structure de quelques tétraterpènes

6- Polyterpène :

Hydrocarbure terpénique de formule générale $(C_5H_8)_n$ (avec n supérieur à 3), le caoutchouc naturel est un composé qui en dérive.

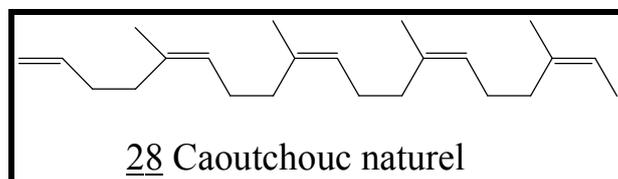


Figure 12: Structure de caoutchouc

I-3-3- Les propriétés des terpènes :

Les terpènes sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques [29].

Les terpènes, principaux constituants des huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes, employés depuis les temps reculés pour leurs effets thérapeutiques, présentent des propriétés antiseptiques, digestives, antispasmodique, sédatives, irritantes, cicatrisantes.... Dues surtout à leurs constituants terpéniques [30].

I-4-Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèse et d'activités pharmacologiques. Ils sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote [31], typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde.

I-4-1-Les différentes classes des alcaloïdes :

On distingue trois grandes classes des alcaloïdes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct, et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle :

A- Les alcaloïdes vrais :

L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle, la figure 13 montre des exemples d'alcaloïdes vrais.

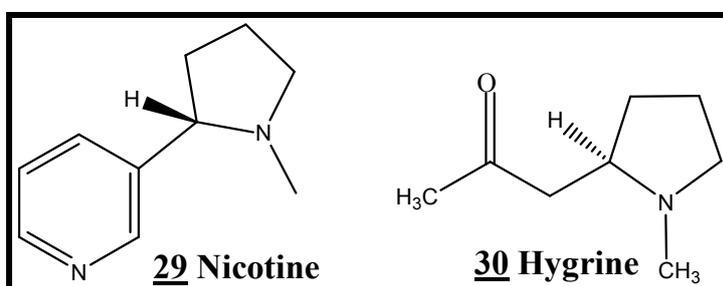


Figure 13 : Exemples d'alcaloïdes vrais

B -Les pseudo-alcaloïdes :

Ils ne possèdent pas d'azote intra-cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale, quelque exemples de ces alcaloïdes sont indiqués dans la figure 14 :

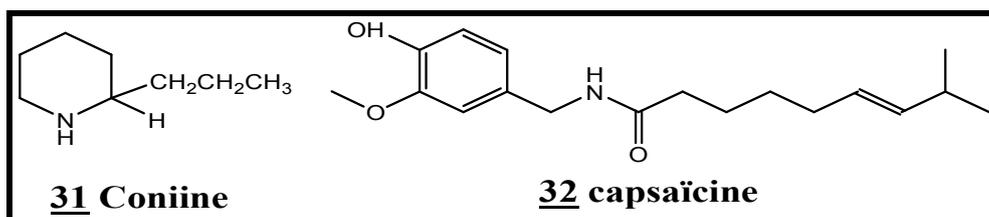


Figure 14 : Exemples de Pseudo-alcaloïdes

C - Les proto-alcaloïdes :

L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle, l'Hordénine et la Mescaline sont des exemples de proto-alcaloïdes représentés dans la figure 15 :

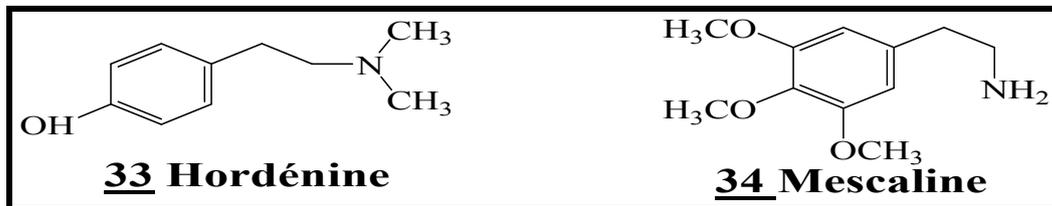


Figure 15 : Exemples de Proto-alcaloïdes

I-4-2-La Biosynthèse des alcaloïdes :

Les figures 16 et 17 montrent la biosynthèse de quelques exemples des différentes classes d'alcaloïdes [12] :

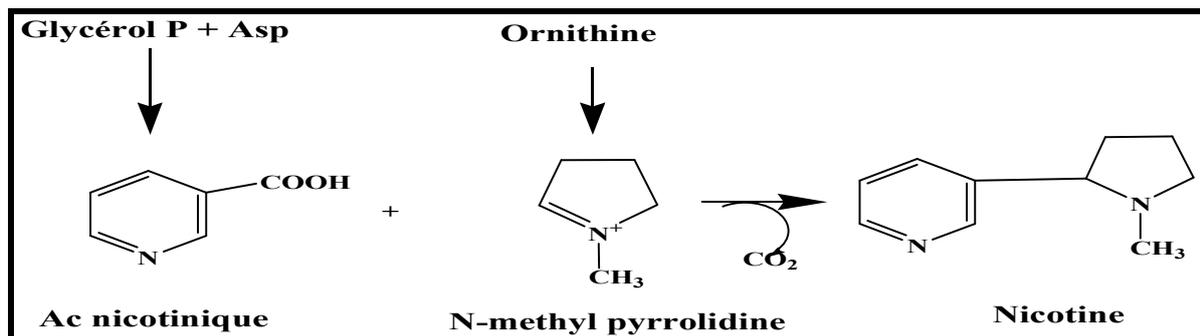


Figure 16 : La biosynthèse de la nicotine (alcaloïde vrais)

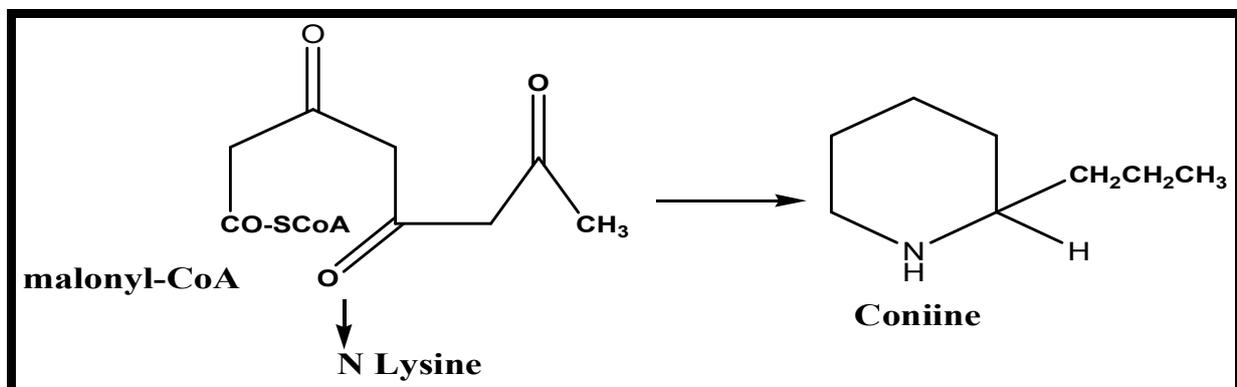


Figure 17 : La biosynthèse de la coniine (Pseudo-alcaloïde)

I-4-3-Propriétés des alcaloïdes :

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) [32].

Les références bibliographiques

[1] Lhuillier A., 2007, Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauriasalicifolia* Hook.f ex Oliver, *agauriapolyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissatrichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embeliaconcinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Univ. Toulouse, p10.

II-1-Le criblage phytochimiques (screening):

Ce sont des techniques (des réactions physico-chimiques) qui permettent de déterminer les différents groupes contenus dans un organe végétal, les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les polyphénols (flavonoïdes, coumarines, anthocyanes, tanins), les terpènes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les alcaloïdes.... etc.

II-2- L'étude phytochimiques des flavonoïdes :

Une étude phytochimique d'une plante passe impérativement par les étapes suivantes :

2-1-Récolte, séchage et broyage de la plante

2-2-Extraction par les différents solvants

2-3-Séparation et purification en utilisant les techniques chromatographiques parmi lesquelles on cite :

2-3-1- Chromatographie sur colonne (CC) :

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes [1].

2-3-2- Chromatographie sur papier (CP);

Il s'agit de la méthode chromatographique la plus ancienne permettant de séparer des mélanges complexes polaires, comme les glycosides, la chromatographie sur papier Wattman reste couramment employée, en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de son efficacité de séparation [2].

2-3-3- Chromatographie sur couche mince (CCM) :

C'est une technique analytique rapide et simple, utilisée au cours de la séparation des différents métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits, (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait et permet un contrôle aisé et rapide de pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées.

II-3-Les technique d'identifications structurales des Flavonoïdes :

II-3-1- La fluorescence sous lumière de Wood des flavonoïdes :

L'examen des flavonoïdes sous lumière UV 365 nm est très utilisé pour leur l'identification. Tous les flavonoïdes apparaissent sous UV sous forme de spots colorés, permettant d'avoir des renseignements pour déterminer leur structure [3-4]. Le tableau 3 résume la relation entre la fluorescence et la nature du produit.

Tableau 3 : Relation entre la fluorescence et la nature du produit flavonique.

<i>La coloration</i>	<i>Type de flavonoïdes</i>
Jaune pâle	Dihydroxyflavonols sans OH libre en 5
Jaune fluorescent	Aurones avec OH libre en 4' et quelques chalcones avec OH en 2 ou en 4
Jaune vert brillant	Aurones sans OH libre en 4' Flavanones sans OH libre en 5
Jaune orange	Flavonols avec ou sans OH libre en 5.
Bleu-claire	Flavones et flavanones 5-O-substituées. Flavonols avec OR en 3 et sans OH libre en 5.
Noire-Violette	5,4'-Dihydroxy flavone ou 3-O-substitué flavonols avec 5-OH, 4'-OH. Quelque flavanones avec OH libre en 5

II-3-2-Révélation :

Parmi les méthodes de révélation ; la révélation chimique est une technique fréquemment utilisée en chromatographie sur couche mince, si les composés sont incolores à l'aide de révélateurs ils seront transformer en taches colorées.

Lors de la migration des constituants de l'échantillon sur la plaque CCM, on peut déterminer pour chacun d'entre eux ce qu'on appelle: le Rapport frontal (R_f) ou coefficient de migration :

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

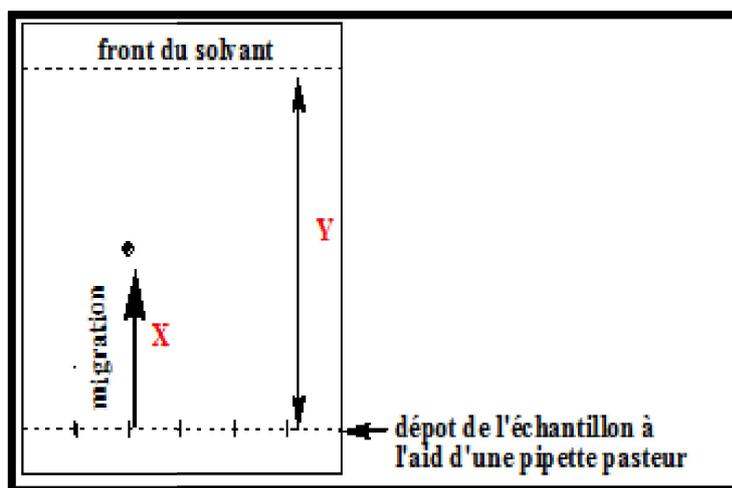


Figure 18 : Schéma d'une plaque CCM

Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un R_f faible ; très soluble dans la phase mobile, son R_f sera élevé et proche de 1.

II-3-3-Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La RMN est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Elle fournit des informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée et les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique [5].

Les tableaux 4 et 5 contiennent quelques déplacements chimiques et constante de couplages des protons du noyau A et B des flavonoïdes [6].

Tableau 4 : Déplacement chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A

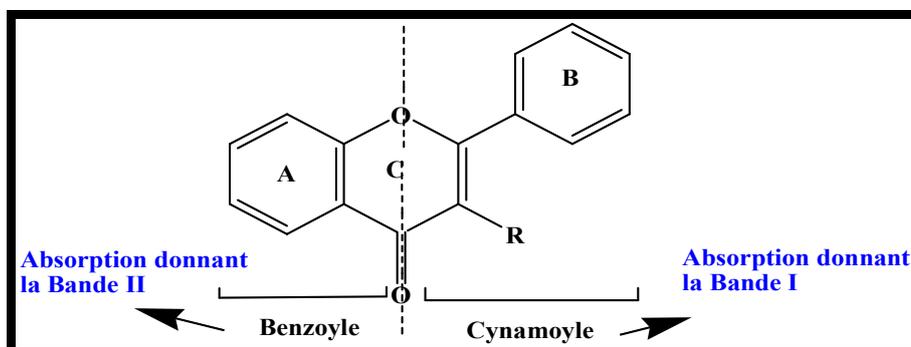
Protons du noyau A Nature du flavonoïde	(H-5) δ , ppm J, Hz	(H-6) δ , ppm J, Hz	(H-8) δ , ppm J, Hz
5, 7 - OH		6,0-6,2 d 2,5	6,3-6,5 d 2,5
5-OH, 7OR (R=Gluc.)		6,2-6,4 d 2,5	6,5-6,9 d 2,5
7-OR (R=H, sucre)	8,0 d 9	6,7-7,1 dd (9,0 ; 2,5)	6,7-7,0 d 2,5
5, 6, 7-OR R=H, sucre 5, 7, 8-OR		6,3 s	6,3 s

Tableau 5 : Déplacement chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B

Protons du noyau B	(H2'-H6') δ , ppm J, Hz	(H3'-H5') δ , ppm J, 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

II-3-4-Spectrophotométrie UV-visible :

C'est une technique très importante pour l'identification des structures des flavonoïdes. Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II. figure 19.

**Figure 19 :** Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

La bande I : Située entre 304-385 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau B conjugué avec le groupe énone donnant la forme cinnamoyle.

La bande II : Située entre 250-280 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau A conjugué avec la fonction cétone donnant la forme benzoyle [7].

La nature des flavonoïdes peut être déterminée selon les valeurs de la bande I et la bande II le tableau 6 montre la relation entre le squelette flavonique et la position des bandes I et II.

Tableau 6 : Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes

Type de flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (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	230-270 faibles intensités
Aurones	380-430	230-270- faibles intensités
Anthocyanidine 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, par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol.

Tableau 7 : Les informations obtenues en présence des réactifs

Réactifs	Déplacement en nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	Flavones
	352-385	250-280	Flavonols (3-OH)
	350-380	250-280	Flavonols (3-OR)
NaOH	+44 à 65 1)- avec stabilité d'intensité 2)-avec diminution d'intensité une nouvelle bande entre 320-335		4'-OH 3-OH et 4'-OR 7-OH
AlCl ₃ /MeOH	+ 20 à 45 + 60		5- OH 3- OH
AlCl ₃ +HCl/AlCl ₃	-20 à -40 -20 à -25		Ortho di OH (noyau B) Ortho di OH (noyau A) +ortho di OH (noyau B)
AlCl ₃ +HCl/MeOH	+ 17 à 20 + 35 à 55 + 50 à 60		5- OH (avec 6- oxygénation) 5-OH flavone et 3-OMe flavone 3- OH avec ou sans 5- OH
NaOAc /MeOH	+ 5 à 20 Déplacement très faible Diminution d'intensité Avec le temps Le spectre se décompose Avec le temps		7- OH 7- OR 6, 7 ; 7, 8 ou 3', 4' di OH 5, 6, 7 ; 5, 7, 8 ou 3, 3', 4' – tri OH
NaOAc + H ₃ BO ₃	+ 12 à 36 + 5 à 10		3', 4' di OH 6, 7, ou 7, 8 di OH

II-4- Etude quantitative :

II-4-1-Dosage des polyphénols totaux :

Les constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée [8].

➤ Principe :

Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi), qui en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols.

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm. Dans cette méthode on a utilisé l'acide gallique comme étalon [9].

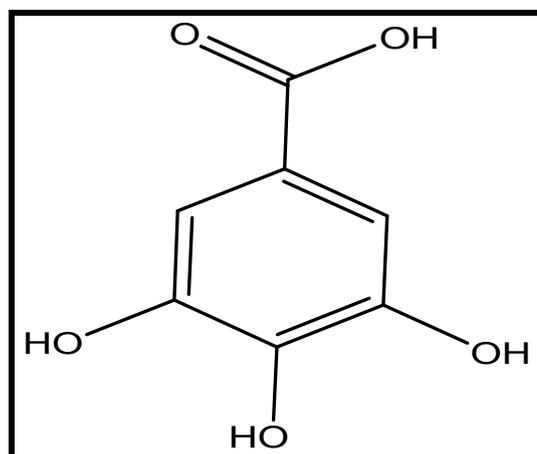


Figure 20: Structure acide gallique

III-4-1-Dosage des flavonoïdes totaux :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes très stable avec les groupements hydroxyles OH des phénols. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 420 nm [10].

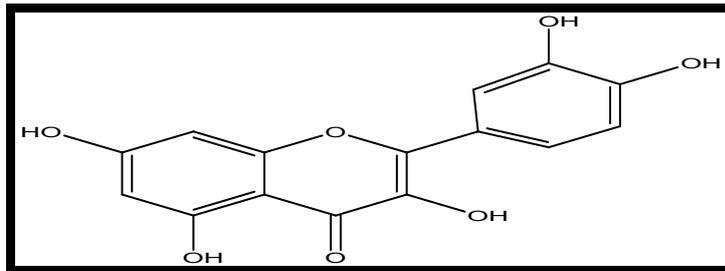


Figure 21 : Structure de la quercétine

Les références bibliographiques

[1] Sell C.S., 2003, Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry, The Royal Society of Chemistry (R.S.C.), p1-2.

[2] Menz J., Winkelmann R. K., 1987, Contact Dermatitis, p16 -169.

[3] Trease G.F., Evans W.C., 1983, Pharmacognosy, Baillière, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janeiro, Tokyo, Hong Kong. p225-514.

[4] Quezel P., Santa S., 1963, Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, CNRS, Paris.

[5] Flamini G., Bulleri C., Morelli I., and Manunta A., 2000, A New Flavonoid Glycoside from *Centaurea horrida*, J. Nat. Prod., p63-622-663.

[6] Bohlman F., Bukhardt T., and Zdero C., 1973, Naturally Occuring Acetylenes, Academic Press, London, p452.

[7] Fortuna A. M., Riscala E.C., Catalan C.A.N., Gedris T.E., and Herz W., 2001, Sesquiterpene Lactones from *Centaurea atweediei*, Biochemical Systematics and Ecology, 29, p967-971-117.

[8] Ahmed Z. F., Hammoud F.M., Rizk A. M., and Ismail S.L., 1970, Planta Med., 18, p227-231.

[9] Picher M., Savane T., and Ampara T. J., 1984, J. Nat. Prod., 47, p184-185.

[10] Macheix J. J., Fleuriet A., and Jay-Allemand C., 2005, Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique ; Ed : Presses polytechniques et universitaires romandes, p4-5.

[11] Urquiaga I., Leighton F.; 2000, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Research., 33 (2), p55-64.

[12] Merghem R., 2009, Elément de biochimie végétale ; Ed : bahaeddine.

[13] Ribereau-Gayon p.,1968, Les Composés phénoliques des végétaux ;Ed :dumonde.Paris.

[14] Erdman J. W .,Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly.,Hollman J.P., Keen C, L.,MazzaG., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG.,Burrowes J., 2007,Flavonoids and Heart Health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition,p718 -737.

[15] Winkly-ShirlyB., 2002,biosynthesis of flavonoids and effects of stress ; current opinion in plant biology ; Elsevier; V5 ,p218-223.

[16] Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R., 2001,Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential.IndianJournalof Pharmacology., 33 ,p2-16.

[17] González-G.J., Sánchez C.S.,Tuñón M.J., 2007, Anti-inflammatory Properties of Dietary Flavonoids.Nutricinhospitalaria, 22 (3), P287-293.

[18] Tapas A.R., Sakarkar D.M., Kakde R.B., 2008,Flavonoids as Nutraceuticals.Topical journal of Pharmaceutical Research., 7 (3), p1089-1099.

[19]DecloitreF., 1993,Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse, bases d'une prévention des cancers par l'alimentation,Cahiers de Nutrition et de diététique, 28 (2),p85-95.

[20] Tiqwari A.K.,2001, Imbalance in antioxidantdefence and humandiseases ,Multiple approach of naturalantioxidantstherapy, Current science, 81 (9) , p1179-1181.

[21] Bylka W., Matlawska I., Pilewski N.A.,2004, Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents; the Journal of the American Nutraceutical Association (JANA), V7 No 2.

[22] KebiècheM.,Lakroun Z., Mraïhi Z., SoulimaniR.,2011, Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens*

L, et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique, Phytothérapie Springer-Verlag France.

[23] Marca A., 2003, radiolyse gamma des flavonoïdes, Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools, formation de depsines, Université de Limoges.

[24] Ahmed A.A., Abou El-Ela.M., Jakupovic, J., Seif El-Din A.A., Sabri.N., 1990, Phytochemistry, 29, p3661–3663.

[25] Dewick P.M., Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. Wiley, 2002.

[26] Allen K. G., Banthorpe D.V., Charlwood B.V., 1977, Phytochemistry 16, p79-83.

[27] Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D., Herbal M; 2007, Pharmaceutical Press, p102-194.

[28] Gideon P., 2003, Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds; a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects, p33-40.

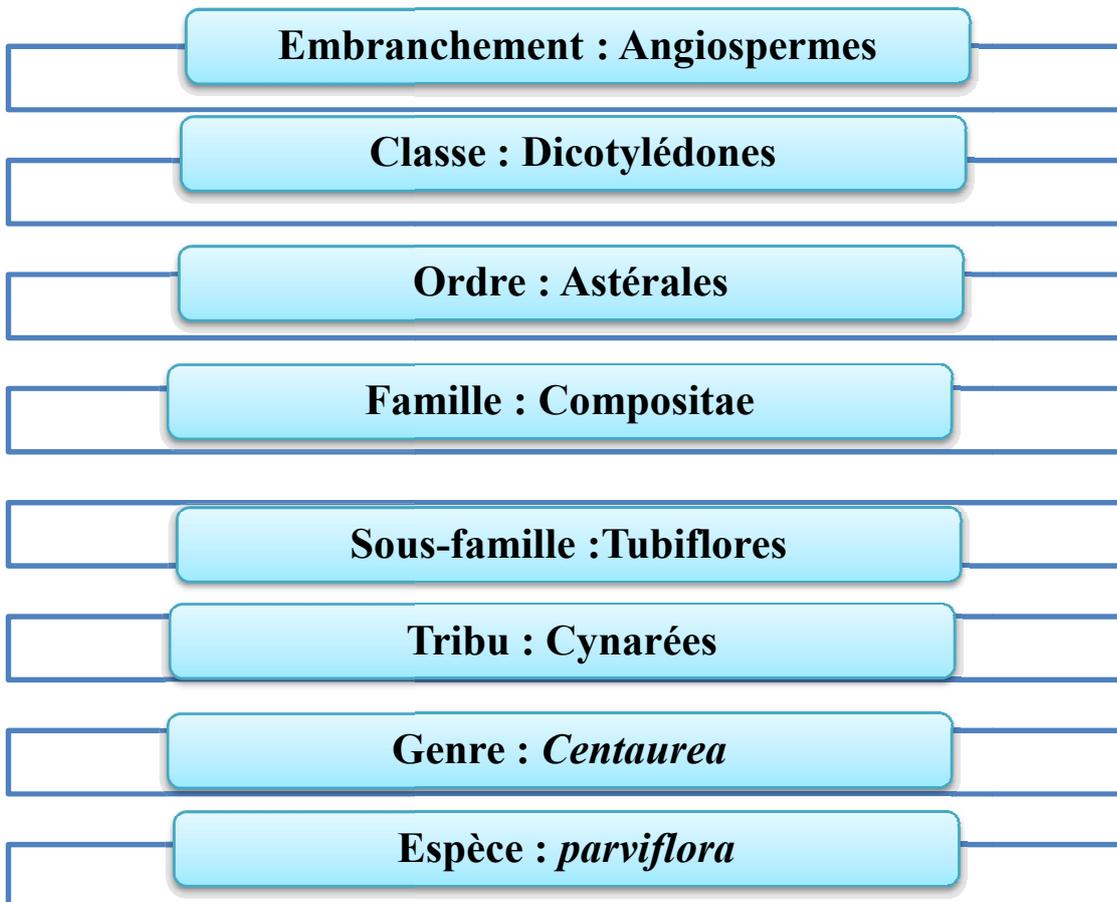
[29] Bruneton J., 1999, Pharmognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris, Ed : médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, p11-20.

[30] Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M., 2008, Food and Chemical Toxicology, 46, p466-475.

[31] Roberts M.F., Wink M., 1998, Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications; Ed: Plenum press, p1- 6.

[32] Kanoun K., 2010, Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen), p96.

III-1-Place dans la systématique :



*Figure 22 : La place systématique de *centaurea parviflora* Desf.*

III-2-Description de l'espèce parviflora:

Appendice des bractées sans partie scarieuse blanchâtre ou à partie scarieuse peu marquée; à 8-12 laciniures latérales. Plantes suffrutescentes à la base, de 40-60 cm, très rameuses, formant des buissons serrés, intriqués. Feuilles supérieures non décurrentes sur la tige. Petits capitules de 5 mm de large sur 15 mm de long, solitaires. Appendices à épine médiane fortement récurvée. Fleurs supérieures. Akènes pubescents, ventrus, noirs, à 4 stries marquées. Aigrette également le 1/3 de l'akène.

Assez rare : en sol algérois, Oran et Tlemcen, Constantine, Hauts plateaux. Elle existe en Algérie et en Tunisie.



Centaurea parviflora

III-3-Etudes phytochimique de l'espèce *centaureaparviflora* Desf. :

III-3-1-Le produit végétal :

La plante a été récoltée au mois de juin de l'année 2004, de la région d'Oum El Bouaghi, Le séchage est effectué à l'abri de lumière et d'humidité.

III-3-2-Le Screening phytochimique :

Matériel végétal : les fleurs et tiges de *centaureaparviflora* séchées sont réduites en poudre au mortier traditionnel. Le protocole réalisé lors de ce screening est le suivant:

III-3-3-1-Recherche des alcaloïdes [1] :

La présence des alcaloïdes est établie par la précipitation des sels et la révélation à l'aide du réactif de DragenDorff (solution aqueuses d'iodo-bismuthite de potassium) :

- Introduire 5g de la poudre végétale dans un erlen Meyer et ajouter 25 ml de l'acide sulfurique dilué à (10%). Après agitation, macération pendant 24 heures et filtration on procède à un lavage avec eau distillée pour obtenir 25ml de filtrat.
- Prélever 1ml de filtrat et ajouter 3 gouttes de réactif de DragenDorff.

Observation : L'apparition d'un précipité orangé ou changement de couleur indique un test positif.

III-3-3-2-Recherche des coumarines [2] :

1 g de la poudre végétale est macérée pendant 24 heures dans 20 ml de l'éther di éthylique, 5 ml d'extrait étheré obtenu sont évaporés à l'air libre, puis repris avec 2 ml d'eau chaude. La solution est divisée en 2 tubes à essai. La présence de coumarines est manifestée après ajout dans l'un des tubes de l'ammoniaque à (25%) et observation de la fluorescence sous UV 365 nm.

Observation : Une fluorescence intense dans le tube contenant de l'ammoniaque indique la présence des coumarines.

III-3-3-3-Recherche des substances polyphénoliques (tanins):

La solution à analyser est un infusé de 50ml d'eau distillée bouillante sur 5 g de matière végétale.

-Tanins catéchiques [3]:

Dans un tube à essai contenant 2 ml de l'infusé, ajouter quelques gouttes de FeCl_3 à 1%, l'apparition de coloration ou la formation d'un précipité indique la présence de tanins catéchiques.

-Tanins galliques [4]:

2ml de l'infusé précédent sont prélevés et mis dans un tube à essai, saturé en acétate de sodium puis on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%). La formation d'un précipité ou le changement de couleur indique la présence des tanins galliques.

III-3-3-4-Recherche des triterpènes, stérols et terpènes:

Elle se fait sur une macération de 5g de matière végétale pendant 24h dans 50ml d'un mélange méthanol/eau (v/v 80 :20), l'extrait hydro alcoolique obtenu après filtration est soumis à une évaporation à sec puis repris avec 20ml de l'éther diéthylique.

+ -Identification des terpènes et stérols[5]:

La phase étherée obtenue est évaporée à sec, puis reprise par 15 ml de chloroforme. La solution ainsi obtenue est divisée en 3 parties :

- **La première partie** : Témoin

- **La deuxième partie** : Ajoutée 3 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés, cette couleur devenue vert foncé montre la présence des terpènes

- **La troisième partie** : Ajoutée quelques gouttes d'acide sulfurique. L'apparition de la couleur rouge cerise montre la présence des stérols insaturés.

+ Identification des triterpènes [4]:

Un volume de 10 ml d'extrait hydroalcoolique est évaporé à sec résidu obtenu est dissous dans 0,5ml d'anhydride acétique et 0,5ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec ou on rajoute 1 à 2 ml de H₂SO₄ au fond du tube.

Observation:

La formation d'un anneau marron à la zone de contact des deux liquides révèle la présence de triterpènes.

III-3-3-5-Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes[6]:

5g de matériel végétal sont infusés dans 50ml d'eau distillée pendant 15 min, après filtration on introduit 6ml du filtrat dans 3 tubes chacun contient 2ml on ajoute dans le tube1 : 1ml de NaOH (1N), dans le deuxième tube on ajoute 1 ml d'eau distillée et dans le troisième tube 1ml de HCl concentrés et quelques copeaux de magnésium, on laisse agir 5 minutes.

Observation:

-En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.

- La coloration rouge au 3^{ème} tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

III-3-3-6-Recherche des saponines[7]:

5g de matériel végétal sont infusés dans 50ml d'eau distillée pendant quelques minutes puis ils sont soumis à une agitation pendant quelques minutes.

Observation:

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

III-3-3-7-Recherche des anthocyanes[8]:

5g de matière végétale est infusé dans 50ml d'eau distillée bouillante pendant 15mn ; filtré et complété à 50 ml. A 5 ml de l'infusé on a ajouté 5 ml d'acide sulfurique à (10%) puis 5 ml de l'ammoniaque à (10%).

Observation :

La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

III-3-3-8-Recherche des quinones[9]:

5 g de poudre végétal humectée avec quelques gouttes de HCl puis sont macéré avec 10ml d'éther de pétrole pendant 24 heures, 2 ml du filtrat obtenu est repris par 2ml de NaOH (10%).

Observation :

La coloration rouge –violet indique la présence des quinones.

III-3-2-Extraction par macération :

100g de la poudre végétale (fleurs / tiges) séchées et broyées sont mises en macération dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/Eau ; 70 : 30 ; v/v) pendant 24 heures 4 fois à température ambiante. Les filtrats obtenus chaque fois sont réunis et évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif.

Le résidu sec est repris dans 40 ml d'eau distillée non bouillante avec modération (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée tiède c'est pour récupérer le maximum de l'extrait hydroalcoolique).

La solution aqueuse est transférée dans une ampoule pour une extraction liquide-liquide par des solvants de polarité croissante :

- Extraction par l'éther de pétrole.
- Extraction par le chloroforme.
- Extraction par l'acétate d'éthyle.
- Extraction par le butanol.

NB.La quantité du solvant est déterminée à partir du volume total,on prend le 1/3.

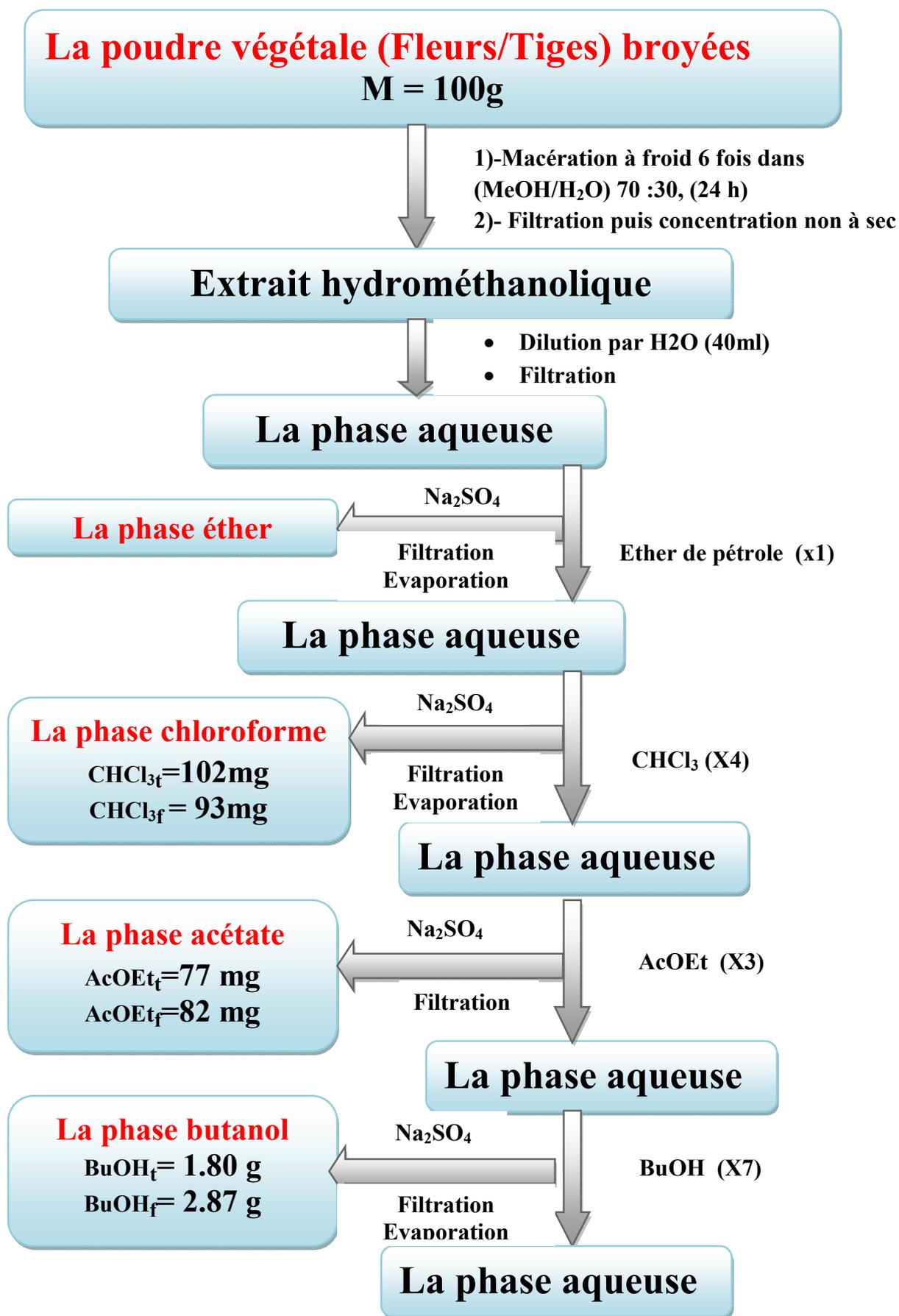


Figure 23 : Les différentes étapes d'extraction

Les extraits obtenus (Chloroforme, Acétate d'éthyle, n-butanol), ont été testés sur plaques chromatographique de gel de silice (CCM) avec des systèmes de solvants appropriés, les plaques ont été visualisées sous lumière Wood (254nm et 365nm), révélées avec un révélateur à base d'anisaldehyde puis chauffées à 100°C, pendant trois minutes. Les plaques sont représentées dans la figure 24.

1) **L'extrait chloroforme (Fleurs-Tiges):**

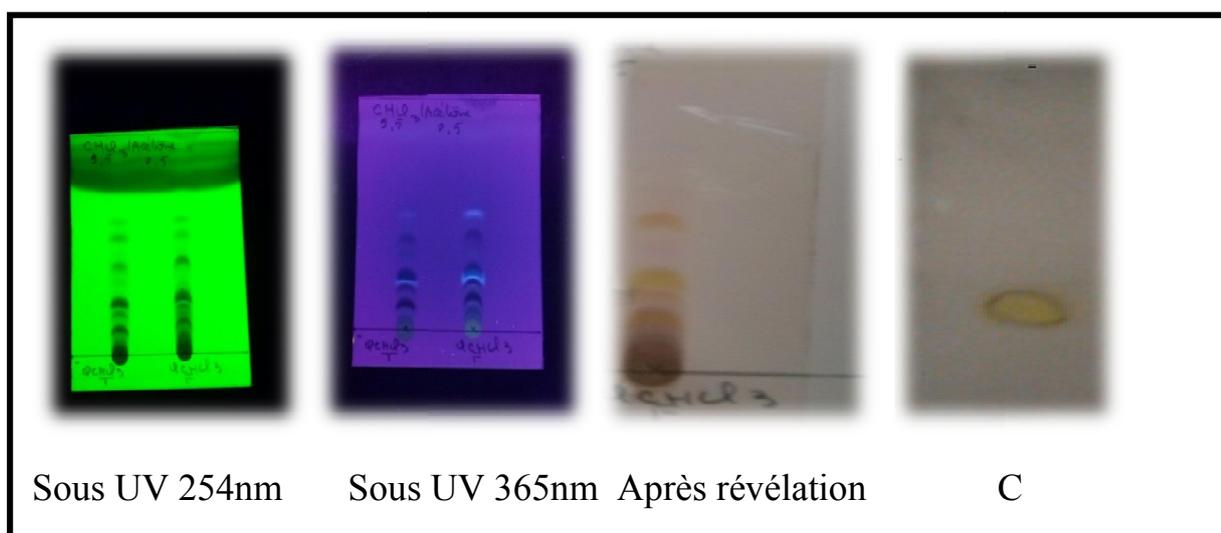
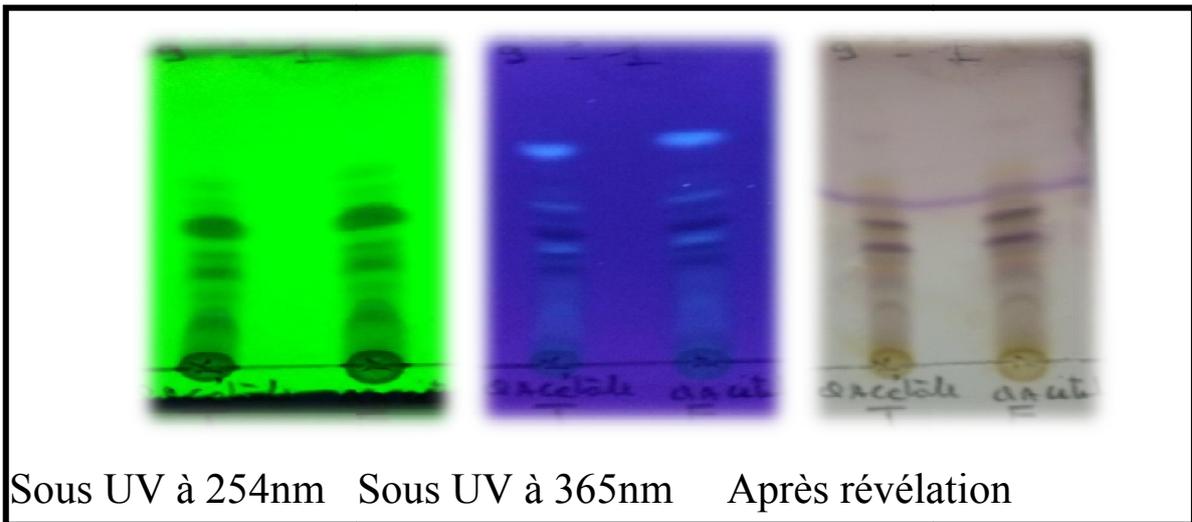
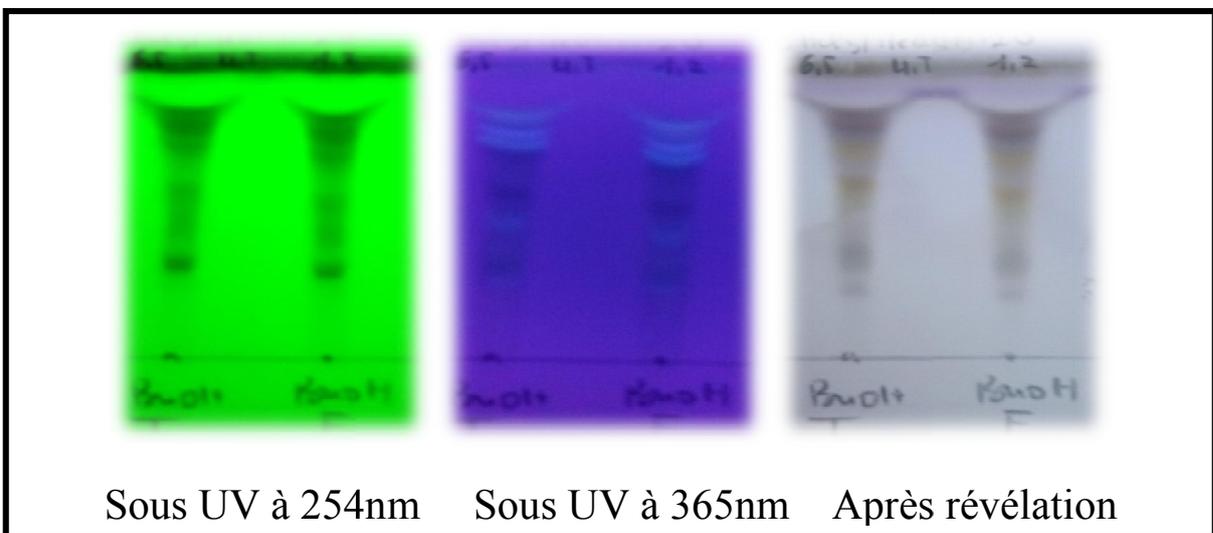


Figure 24 : *Plaque CCM de L'extrait chloroforme (Fleurs-Tiges)*

La plaque CCM confirme la similitude des deux extraits chloroforme des tiges et des fleurs, cette phase se présente sous forme de cristaux jaunes, ces derniers ont subi un lavage avec du méthanol et quelques gouttes de CHCl_3 , l'opération a été répétée plusieurs fois. Les cristaux obtenus sont dissous dans le CHCl_3 testés sur plaque, éluée par le système CHCl_3 / acétone (9/1). La plaque montre un spot unique de couleur noir- violette sous la lumière de Wood (365nm) et une couleur jaunâtre avec les vapeurs d'ammoniac ce qui laisse envisager une molécule de type flavonoïdes c'est le composé C qui sera soumis à une étude structurale.

2)- L'extrait Acétate d'éthyle (Fleurs-Tiges):*Figure 25 : Plaque CCM de L'extrait Acétate d'éthyle (Fleurs-Tiges.)***3)- L'extrait n-butanol (Fleurs-Tiges):***Figure 26 : Plaque CCM de L'extrait n-butanol chloroforme (Fleurs-Tiges).*

Le plaque analytique confirme la similitude des extraits fleurs et tiges, dans cette phase on a remarqué la présence d'un précipité abondant, il sera l'objet d'une autre étude phytochimique et structurale.

IV-4-Quantification des polyphénols et des flavonoïdes:

IV-4-1- Dosage des composés phénoliques totaux:

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations à partir d'une solution mère (2mg/2ml).

Pour la gamme d'étalon :

500 µg/ml	→	0.50 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A1
400 µg/ml	→	0.40 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A2
300 µg/ml	→	0.30 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A3
200 µg/ml	→	0.20 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A4
100 µg/ml	→	0.10 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A5
50 µg/ml	→	0.05 ml de SM + 0.50 ml d'eau distillé	→ A6

Préparation de l'extrait de plante : une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml d'eau distillé pour obtenir la solution mère.

Procédure :

125µl de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500µl d'eau distillé, suivis de l'addition de 125µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min 1250µl de carbonates de sodium à 2% ont été ajoutées, les solutions ainsi obtenues ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols.

Le protocole de dosage est illustré dans la figure 27 :

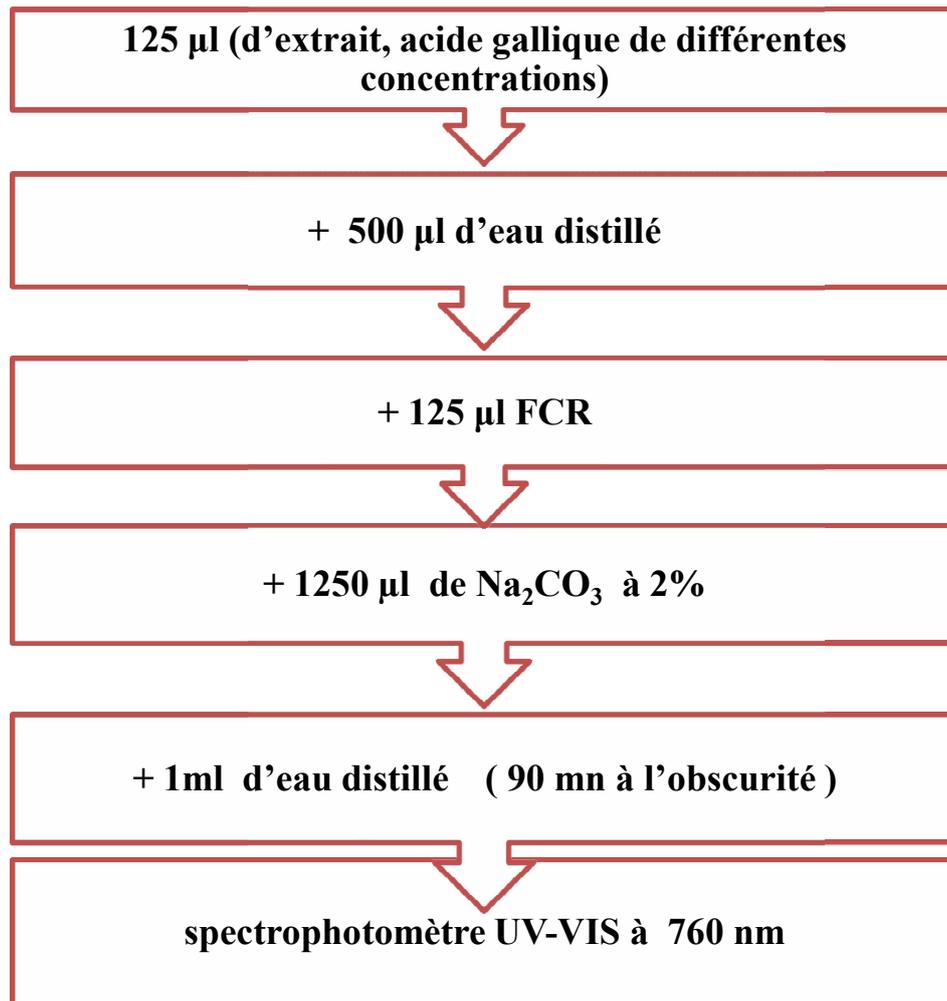


Figure 27 : Schéma illustratif de la méthode de dosage des polyphénols

IV-4-1- Dosage des flavonoïdes :

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions de la quercétine de différentes concentrations à partir d'une solution mère (4mg/4ml).

Pour la gamme d'étalon :

1000 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A1
500 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A2
250 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A3
125 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A4
62.5 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A5
31.25 µg/ml	→ 2 ml de SM + 2 ml AlCl ₃	→ A6

Préparation de l'extrait de plante : une masse de 4 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 4 ml d'éthanol pour obtenir la solution mère.

Procédure :

Des volumes égaux de différentes concentrations de la quercétine et une solution AlCl_3 à (2%) sont mélangés. L'absorbance est mesurée à 420nm, après incubation à température ambiante pendant 60 min. Dans les mêmes conditions et de la même façon sont mesurées les absorbances.

Le protocole de dosage est illustré dans la figure 28 :

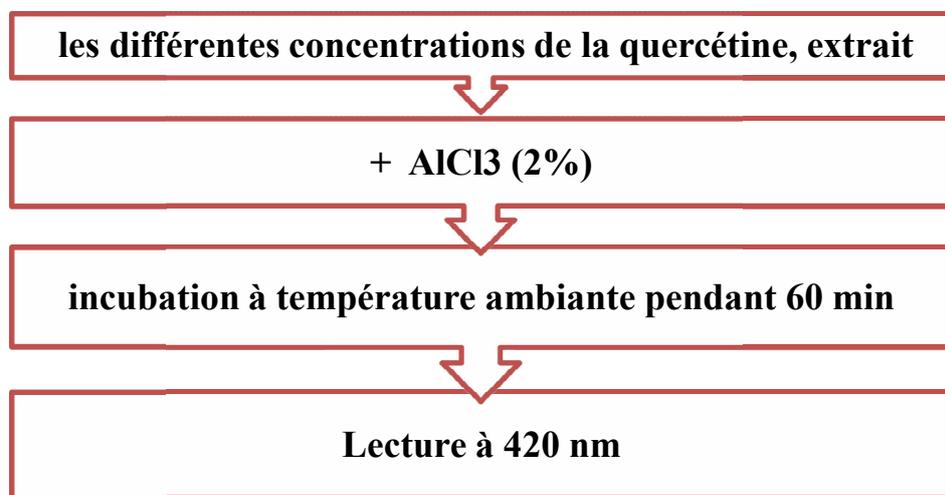


Figure Schéma illustratif de la méthode de dosage des flavonoïdes

Les références bibliographiques

[1] Loiseleur J., 1973, Techniques de laboratoire, chimie physique, chimie biologique, tome 1, éditeurs Masson et Cie.

[2] Stage Mafpen., 1998, Des cours en chromatographie. Lycée Louis Vincent Metz.

[3] Markham K.R., 1982, Techniques of Flavonoids Identification, Academic Press, London.

[4] Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., 1970, The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg, p254.

[5] Blümich B., 2005, Essential NMR Essential NMR for Scientists and Engineers Springer, p1.

[6] Simpson J.H., 2008, Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy, p13- 83.

[7] Jacobsen N.E., 2007, NMR spectroscopy explained Simplified Theory Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology; ed; Wiley, p1-30.

[8] Slinkard K., Singleton V.L., 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult. 28. p49-55.

[9] Singleton, V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999, Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Met. Enzym. 299, p152-178.

[10] Singleton V.L., Rossi J.A., 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphor-Molybdic-phosphotungstic acid reagent. Amer. J. Enol. Viticul., 16(3), p144-158.

Les références bibliographiques

[1] Hladik C.M., 2000, Rôle des Produits Secondaires (tanins et alcaloïdes des espèces forestières de l'est de Madagascar face à populations animales). *Diversity and Endemism in Madagascar*, p107.

[2] Koudougou K., 2000, Étude de la Chimie et de l'Activité Antimycosique des extraits de *Biophytumpetersianum* Klotzsch (Oxalidaceae), université de Ouagadougou – DEA, p16.

[3] Kongo-Nzuzi Y., 2009, Evaluation in Vitro des Pouvoirs Antifongique des Extraits de Feuille de *Papayer* sur des Souches de *Candidas Albicans*, ISTM Kinshasa, p25.

[4] Mibindzou M.A., 2004, Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalariaretusa* L (Papilionaceae ; *Mitragynaciliata* Aubrev ; and *Pellegr.* (Rubiaceae) récoltées au Gabon, p62.

[5] Bekro Y. A., Mamyrbekova Bekro J. A., Boua B. B., rabi F. H., Éhilé E. E., Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinibenthamiana* (Baill). Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae) ; Sciences & Nature.

[6] Bouquet A., 1972, Plantes médicinales de Congo Brazzaville ; Travaux et document O.R.S.T.O.M paris ; N°13, p9.

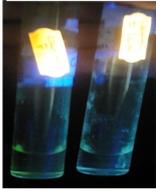
[7] Lokadi L.P., 2008, Etude Chimique de l'espèce *JacobiniaCarnea*. Université de Lubumbashi.

[8] Dohou N., Yamini K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., 2003, Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, thymelaealythroïdes; Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, p66 .

[9] Najjaa H., Zouari S., Arnault I., Auger J., Ammar R., Neffati M., 2011, Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L ; and *Allium ampeloprasum* L ; Acta Bot. Gallica : V158 ; N°1, p111-123.

IV-1- Screening :

Tableau 8 : Les différents résultats de screening.

Recherche	Fleurs	Tiges	Résultats
<i>Alcaloïdes</i>	-	-	 Absence d'un précipité orangé ou changement de couleur
<i>Coumarines</i>	+	+	 Présence d'une fluorescence
<i>Tanins cathéchiques</i>	++	+	 Présence d'un précipité

<i>Tanins galliques</i>	++	+	 changement de couleur
<i>Stérols :</i> - Saturés - Non saturés	+	++	 changement de couleur
<i>Triterpènes</i>	++	+	 formation d'un anneau marron
<i>Flavonoïdes</i>	++	+	 Couleur jeune
<i>Leucoanthocyanes</i>	++	+	 Couleur rouge
<i>Anthocyanes</i>	-	-	 Absence de couleur bleu-violacée
<i>Saponines</i>	++	++	 Présence d'une mousse persistante
<i>Quinones</i>	-	-	 Absence de couleur rouge-violet

++: Abondant ; +: présence modérée ; - absent.

IV.1.1 Conclusion et interprétation :

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes :

- La majorité des groupes chimiques testés sont présents en quantité variable
- La présence des flavonoïdes, tanins, saponines, Leucoanthocyanes, Triterpènes et coumarine est importante dans les différents organes tiges et fleurs
- Une forte présence des flavonoïdes, saponines, Leucoanthocyanes, Triterpènes et les tanins dans les tiges et les fleurs
- Absence totale des alcaloïdes, anthocyanes, quinones et les stéroïdes non saturés

IV-2- Identification du composé C :

IV-2-1- La fluorescence :

Sous la lumière UV 365 nm la fluorescence de ce composé est noire-violette, d'où l'on peut déduire que ce composé est un flavone ou un flavonol-3-OR.

IV.2.2- Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation :

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 9: Résultats de la série spectrale UV-Visible.

Les réactifs	BANDE I (nm)	BANDE II (nm)	Observation
MeOH	339	276	Flavone
NaOH	333	281	Absence de 4'-OH et 7-OH
NaOH+ 5min	333	281	Spectre stable
AlCl ₃	367	289	5-OH
(AlCl ₃ +HCl)	362	289	5-OH avec 6-oxygénation, pas de système ortho di-OH
NaOAc	339	276	Absence de 7-OH
(NaOAc+H ₃ BO ₃)	339	276	Absence de système ortho di-OH

La fluorescence noire-violette sous la lumière UV-Visible 365 nm, et la valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le méthanol à 339 nm, oriente vers une flavone.

Le spectre enregistré après l'addition de NaOH dans l'échantillon ne provoque aucun changement notable par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui suppose l'absence d'hydroxyles ionisables dans cette molécule. Cette hypothèse est confirmée par le spectre enregistré en présence de NaOAc qui lui non plus ne présente aucun changement par rapport à celui enregistré dans le méthanol.

Le réactif (AlCl₃+ HCl) donne un déplacement bathochrome de 23 nm, de la bande I ce qui conclut l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6. D'après cette interprétation nous proposons la structure partielle suivant :

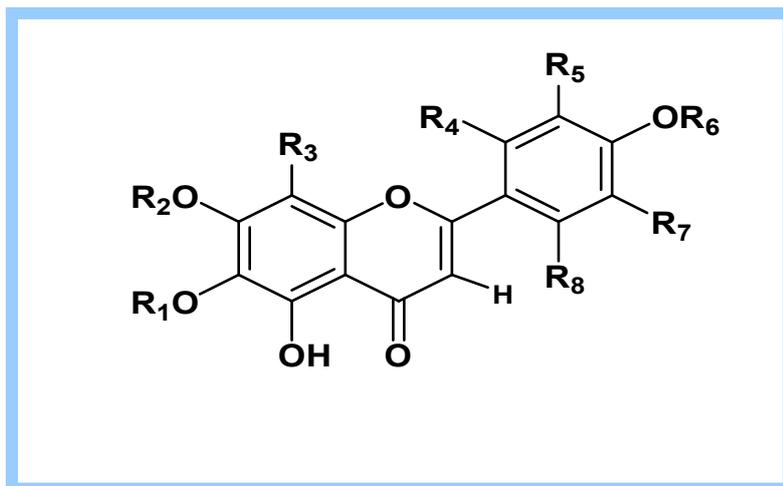


Figure 29 : Structure partielle du composé C.

Avec : R₁, R₂, R₆ différents de H et R₃, R₄, R₅, R₇, R₈ différents de OH, vu que
Cette molécule ne doit pas contenir de OH ionisable même par une base forte
comme NaOH.

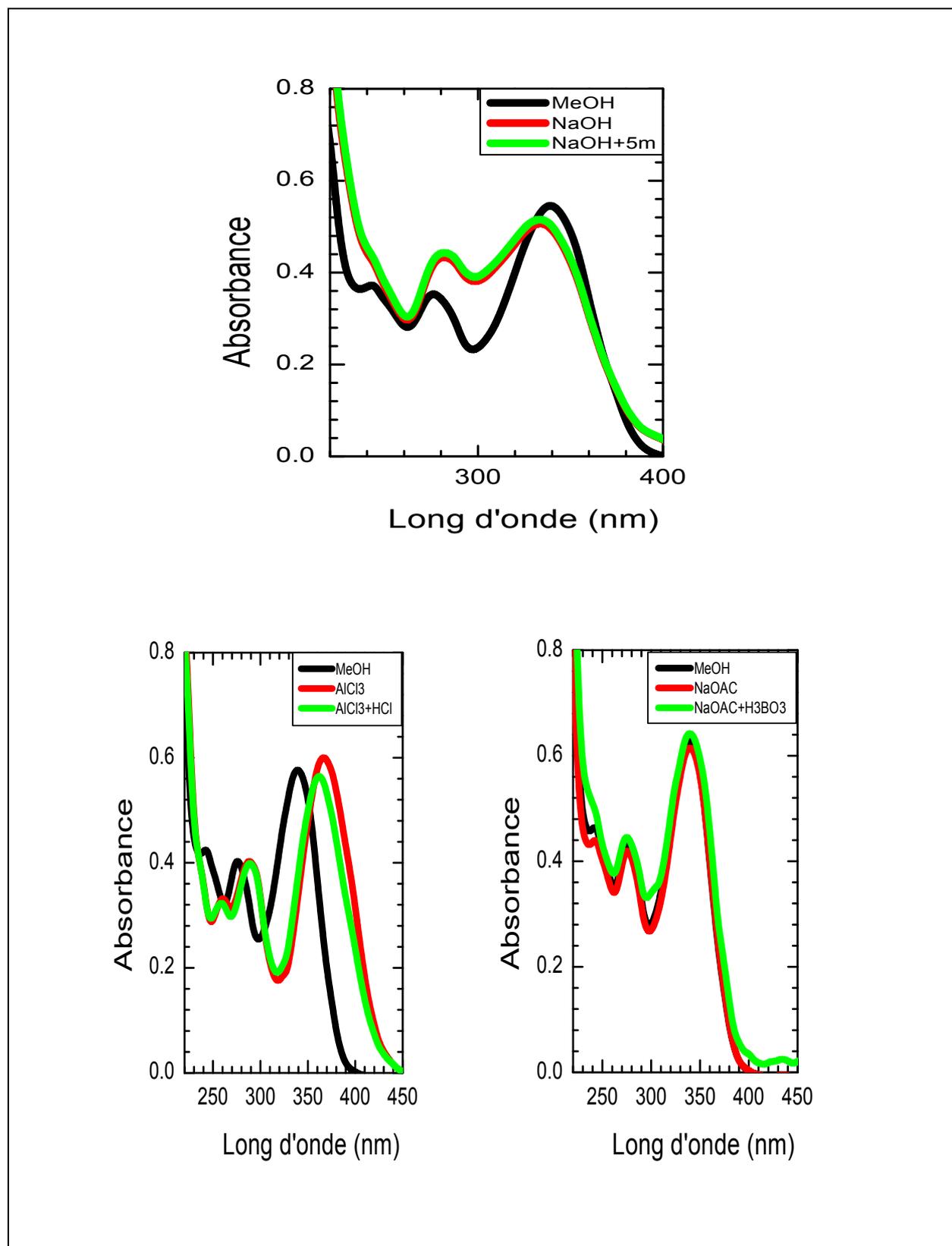


Figure 30: Les résultats de la série spectrale UV-visible.

IV.3.3 Spectroscopie RMN ^1H :

Le spectre RMN ^1H (spectre n°1) donne les informations suivantes :

- Un doublet dédoublé à $\delta = 7,50$ ppm, $J = 8,5$ Hz et $J = 2,1$ Hz attribué à H-6' qui indique la présence de H-5' et H-2'.
- Un doublet à $\delta = 7,28$ ppm, attribué au proton H-2'.
- À $\delta = 6,96$ ppm, un doublet ($J = 8,5$ Hz), attribué à H-5'.
- Un singulet à $\delta = 6,50$ ppm, attribué à H-3.
- Un singulet à $\delta = 6,65$ ppm, attribue à H-8.
- L'étalement du spectre proton de la zone [3,90-4,00] ppm, montre quatre singulets, correspondant à des groupements méthoxyles à $\delta = 3,92$; 3,69 ; 3,97 et 3,99 ppm.
- un singulet à $\delta = 12,30$ ppm, correspondant au OH porte par C-5.

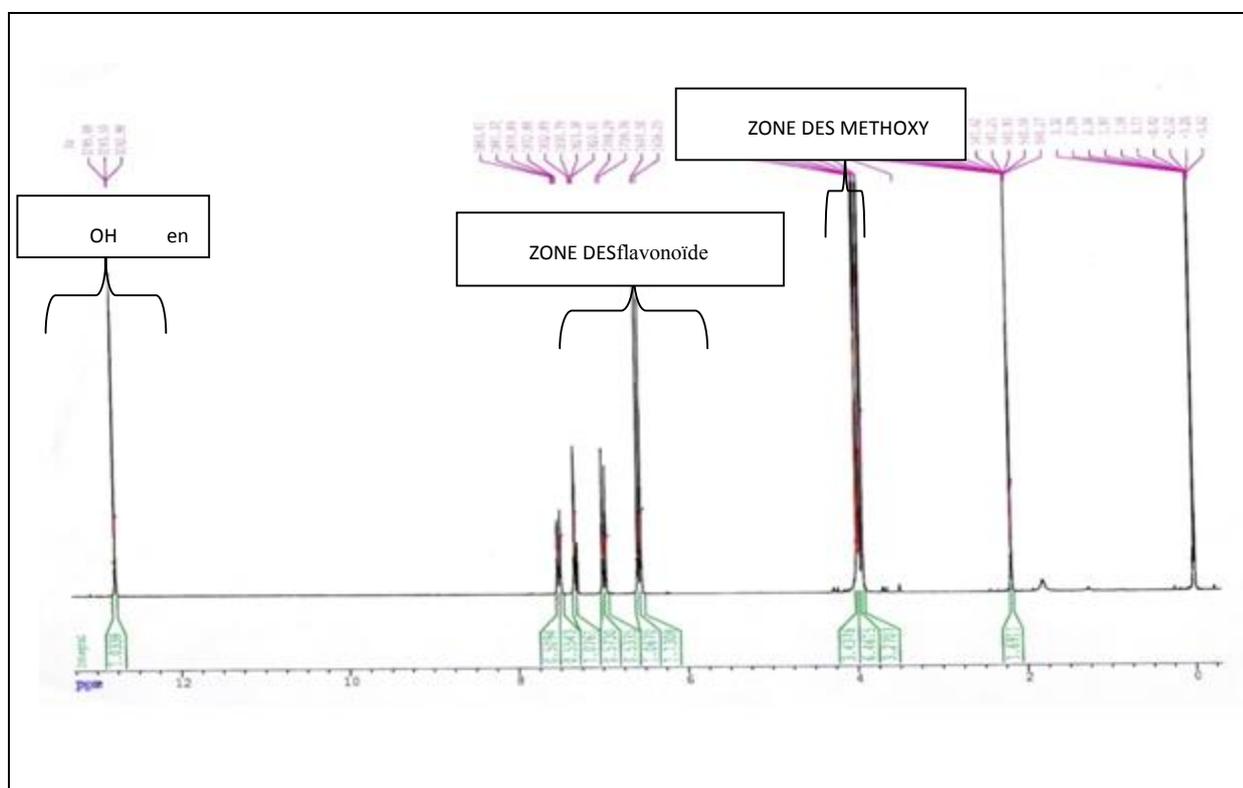
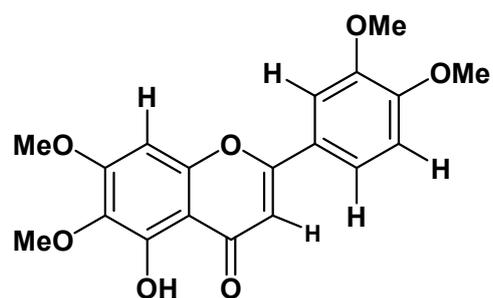
Les résultats de la RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H .

Les protons	Multiplicité	Déplacement (ppm)	J (Hz)
1-OCH ₃	s	3,92	/
1-OCH ₃	s	3,96	/
1-OCH ₃	s	3,67	/
1-OCH ₃	s	3,99	/
H-3	s	6,50	/
H-8	s	6,65	/
OH-5	s	12,30	/
H-2'	d	7,28	2,1
H-5'	d	6,96	8,5
H-6'	dd	7,50	8,5; 2,1

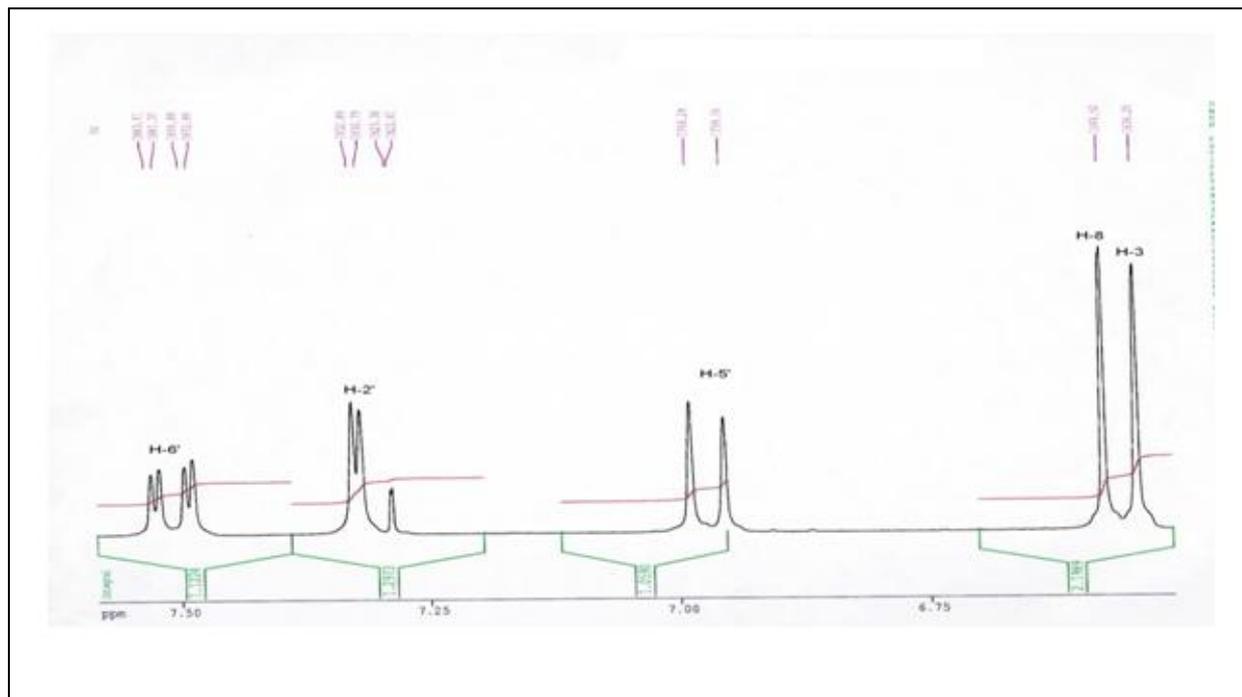
L'ensemble des données précédentes nous a guidés à la structure suivante :

5-hydroxy-6,7,3',4'-
tetramethoxyflavone

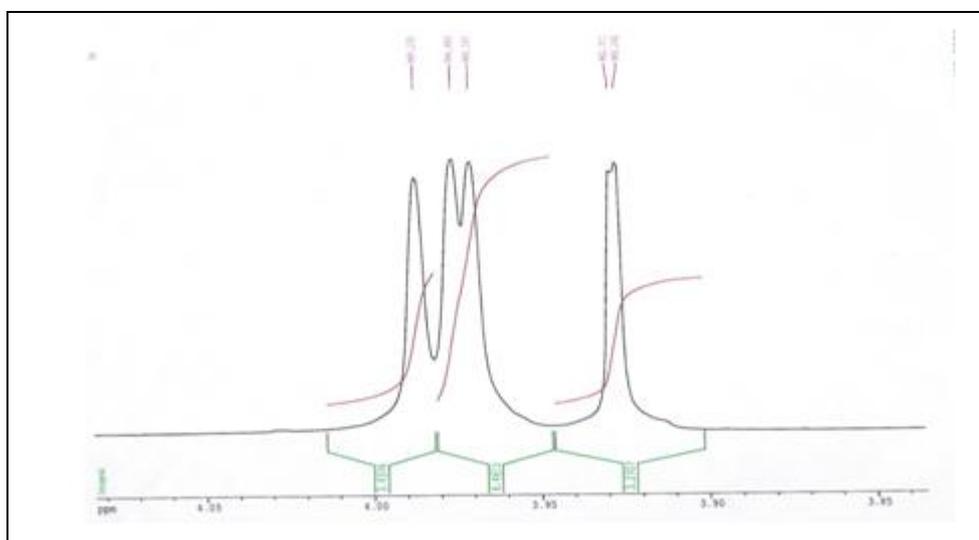


Spectre n°01 : Etallement du spectre RMN-¹H de la zone [0 -12.5]ppm.

Les spectres n° (2et 3) montre l'étallement de la zone [6,5 -7,5] ppm et la zone [3,90 -4,0] ppm du spectre RMN-¹H du composé C.



Spectre n°02 : Etalement du spectre RMN-¹H de la zone [6.5 -7.5]ppm.



Spectre n°3 : Etalement du spectre RMN-¹H de la zone [3,9- 4,0] ppm.

IV -3-Quantification des composés phénoliques :

IV.3.1 Dosage des phénols totaux :

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 exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ d'extrait).

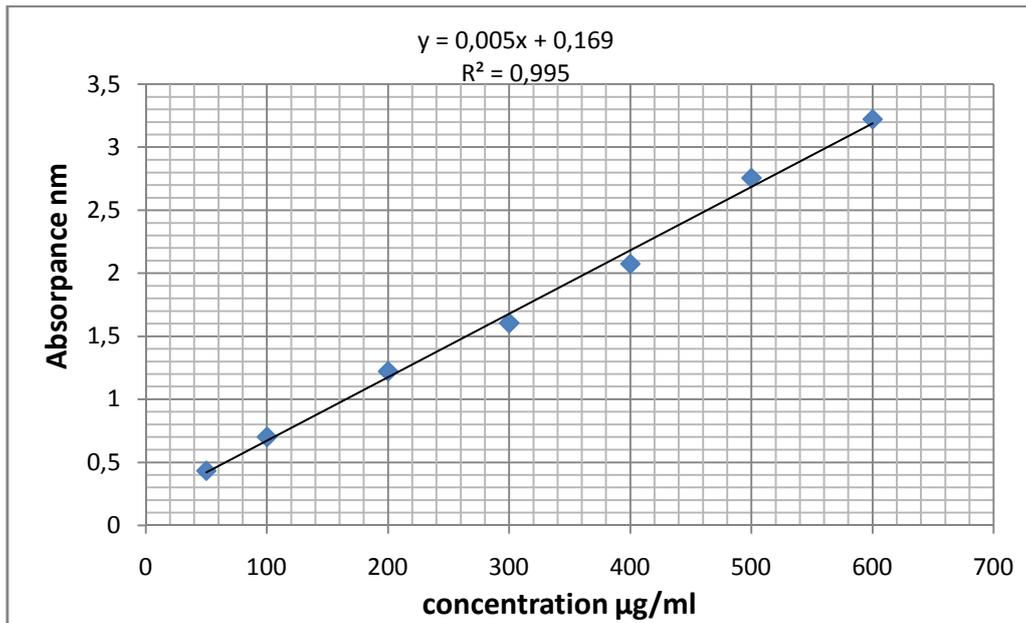


Figure 31 : La Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV.3.2 Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïde est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{gEQ}/\text{mg}$).

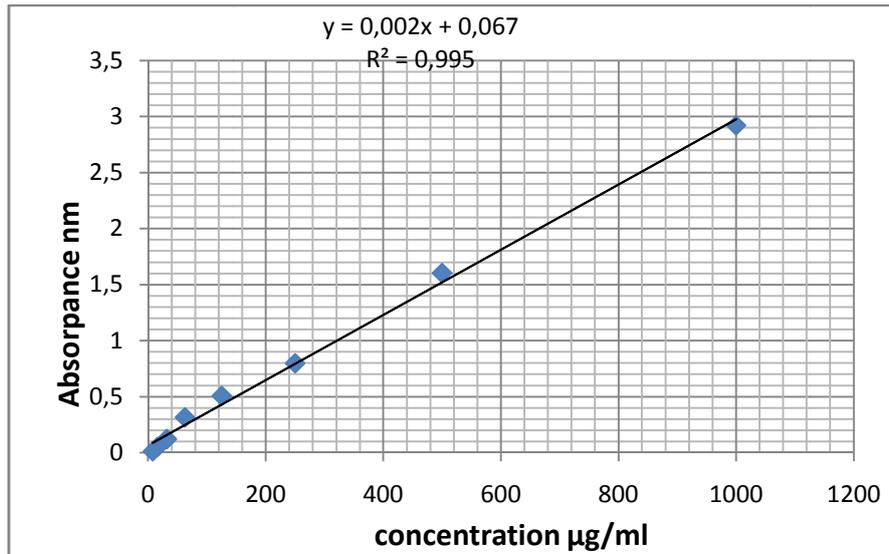


Figure 32 : La Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

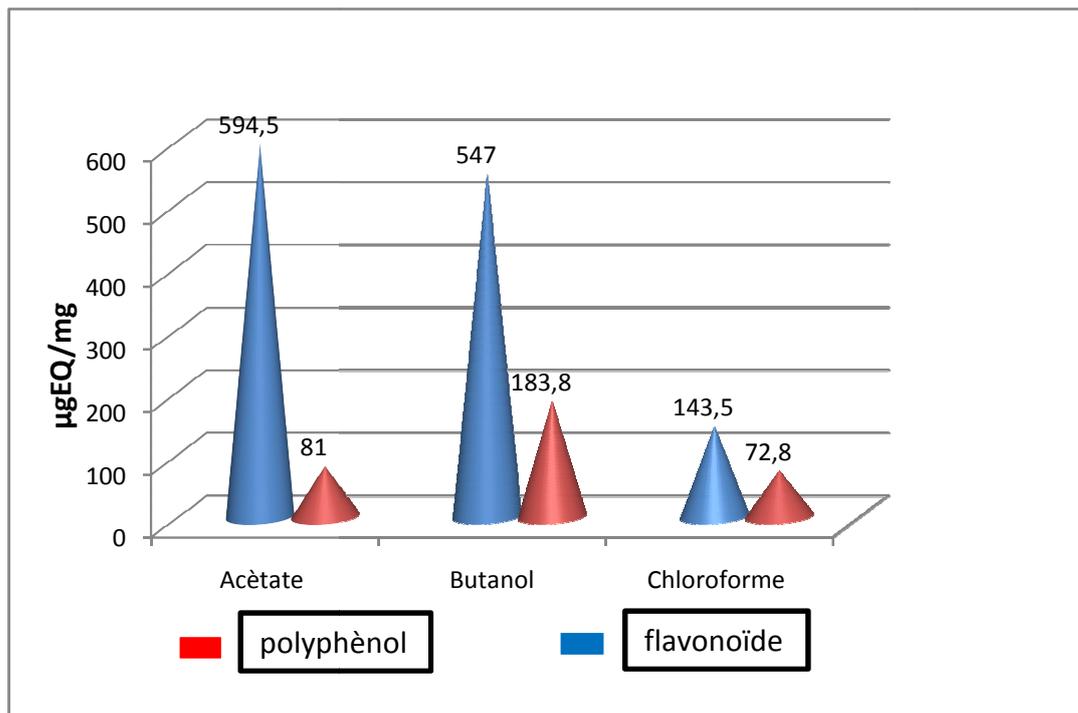


Figure 33: Teneur en flavonoïdes et en polyphénol dans les extraits préparés.

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

- Les teneurs en polyphénols enregistrées, en équivalent d'acide gallique, sont plus importantes dans l'extrait n-butanol (183.8 $\mu\text{gEAG/mg}$ d'extrait) que dans l'extrait acétate d'éthyle(81 $\mu\text{gEAG/mg}$ d'extrait).
- Par contre les teneurs en flavonoïdes enregistrées en équivalent de quercetine sont plus importantes dans l'extrait acétate d'éthyle (594.5 μg

EAG/mg) d'extrait que dans l'extrait n-butanol (547 μ gEAG/mg d'extrait).

- L'extrait chloroforme présentes les teneurs les plus faibles par rapport des deux autres extraits

CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea parviflora*. Les critères du choix de cette plante est dû au fait que le genre *Centaurea* a montré d'une part qu'il est doué d'activités biologiques et d'autre part que c'est un excellent accumulateur de molécules de type terpénique et flavoniques.

En premier lieu, le criblage phytochimique de l'espèce a révélé la présence des flavonoïdes, tanins, triterpènes, saponines et des leucoanthocyanes dans ces parties tiges et fleurs.

Après extraction du matériel végétal suivi d'affrontements par des solvants de polarité croissante. Les extraits obtenus (Chloroforme, Acétate d'éthyle, n-butanol), ont été testés sur plaques chromatographique de gel de silice (CCM) avec des systèmes de solvants appropriés.

L'étude de l'extrait chloroforme a permis l'obtention par les différentes méthodes notamment la RMN et la spectroscopie UV –visible d'un produit et d'établir sa structure :

- 5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone.

En outre, ce travail nous a permis de quantifier les flavonoïdes et les composés phénoliques en utilisant des techniques suivantes : La méthode au chlorure d'aluminium pour les premiers et la méthode de Folin ciocalteau pour les secondes.

ملخص

Centaurea parviflora Desf.

العمل المطروح يختص بدراسة فيتوكيميائية للنوع

في البداية، تم الفحص الفيتوكيميائي على عضوين من المادة النباتية (أزهار. سيقان) النتائج سمحت بتحديد وجود العديد من المركبات الثانوية بما في ذلك مركبات الفلافونويد والتربينات ، الخ

دراسة مستخلص الكلوروفورم سمحت بالحصول على مركب من نوع الفلافونويد، وقد تم تحديد بنيته من خلال مزيج من بيانات الرنين المغناطيسي النووي والتحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية مرئية و هي:

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone

من ناحية أخرى تم تحديد مجموع محتويات البوليفينول والفلافونويدات باستخدام الأساليب اللونية حيث تم الكشف أن مستخلص البيتانول غني بمركبات البوليفينول و مستخلص الأسيتات غني بالفلافونويد.

كلمات البحث

Centaurea parviflora, الاستخلاص, الفلافونويد, دراسة فيتوكيميائية ,

Résumé

Le présent travail est consacré à une étude phytochimique de l'espèce *Centaurea parviflora* Desf.

Dans un premier temps, un screening phytochimique a été réalisé sur deux organes de la matière végétale (fleurs et tiges). Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les terpénoïdes, etc.....

L'étude de l'extrait chloroforme a permis l'obtention d'un composé de type flavonoïde, sa structure a été établie par la combinaison des données RMN et de la spectroscopie UV-Visible, il s'agit de :

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetraméthoxyflavone.

D'autre part la détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes en utilisant les méthodes colorimétriques a révélé la richesse de l'extrait n- butanol en composés polyphénoliques et l'extrait acétate d'éthyle en flavonoïdes.

Mots clés : *Centaurea parviflora*, métabolites secondaires, screening phytochimique, macération, dosage.

Summary

The present work is devoted to a phytochemical study of the specie *Centaurea parviflora* Desf.

Initially, a phytochemical screening was performed on two bodies of the plant material (smells and stems). The results were used to identify the presence of several secondary metabolites including flavonoids and terpenoids, etc.....

The study of the chloroform extract allowed the obtaining of a compound of flavonoid type, their structure was established by a combination of NMR data and the UV-visible spectroscopy, it comes to:

5-hydroxy-6,7, 3', 4'-tetramethoxyflavone.

On the other hand the determination of the total polyphenol contents and flavonoids using colorimetric methods revealed the richness of the n-butanol extract of polyphenolic compounds and the ethyl acetate extract of flavonoids.

Keywords: flavonoïds, screening, *Centaurea parviflora* desf, phytochemical screening, dosage.

Présentée par :

CHOUH AMINA et CHAOUA DJAMEL

soutenu le 17-06-2015

Etude phytochimique de l'espèce

Centaurea parviflora Desf.

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

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé.

Résumé :

Le présent travail est consacré à une étude phytochimique de l'espèce *Centaurea parviflora* Desf.

Dans un premier temps, un screening phytochimique a été réalisé sur deux organes de la matière végétale (fleurs et tiges). Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les terpénoïdes, etc.....

L'étude de l'extrait chloroforme a permis l'obtention d'un composé de type flavonoïde, sa structure a été établie par la combinaison des données RMN et de la spectroscopie UV-Visible, il s'agit de :

5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetraméthoxyflavone.

D'autre part la détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes en utilisant les méthodes colorimétriques a révélé la richesse de l'extrait n-butanol en composés polyphénoliques et l'extrait acétate d'éthyle en flavonoïdes.

Mots clés : *Centaurea parviflora*, métabolites secondaires, screening phytochimique, macération, dosage.

Encadreur : BELBACHE HANENE