



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Spécialité: Chimie Organique

Par :

**Mr ZIANE Laid**

Sur le thème

---

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION  
BIOLOGIQUE DES EXTRAITS ORGANIQUES  
DES DIFFERENTES PARTIES DE *LIMONASTRIUM*  
*Feei – Blombaginaceae – (Mlefet Khadem)***

---

Soutenu publiquement le 05/06/2016 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Harek Yahia	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr LAZOUNI Hamadi A/Rahmane	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr MOUSSAOUI Abdallah	Professeur	Université de Béchar	Co-Directeur de thèse
Mr MEDDAH Boumédiène	Professeur	Université de Mascara	Examineur
Mr BENMEHDI Houcine	Maître de Conférence	Université de Béchar	Examineur
Mr SELLES Chaouki	Maître de Conférence	Université de Tlemcen	Examineur

**LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS (LAPRONA) – TLEMCCEN  
LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES  
ET SECURITE SANITAIRE DANS LES ZONES SEMI-ARIDES (VRVSA)-BECHAR**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**



**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

**FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DE  
CHIMIE**

**LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS (LAPRONA)**

**LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES  
ET SECURITE SANITAIRE DANS LES ZONES SEMI-ARIDES (VRVSA)**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE DOCTORAT En-SCIENCES**

**Option : Chimie Organique**

**par ZIANE LAID**

**Thème :**

**Etude phytochimique et évaluation biologique des extraits  
organiques des différentes parties de *Limoniastrum Feei* –  
*Blombaginaceae* - (Mlefet Khadem)**

Soutenu le:

Devant la commission d'examen composée de:

Mr. Harek Y.	Pr. Président	Université de Tlemcen
Mr. MEDDAH B.	Pr. Examineur	Université de Mascara
Mr. BENMEHDI H.	M.C (A) Examineur	Université de Béchar
Mr. SELLES C.	M.C (A) Examineur	Université de Tlemcen
Mr. LAZOUNI H.A.	Pr. Directeur de Thèse	Université de Tlemcen
Mr. MOUSSAOUI A.	Pr. Co-Directeur de Thèse	Université de Béchar

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 – 2016**

# *Dédicace*

*A la mémoire de mon père*

*A ma mère que dieu la garde.*

*A ma chère femme et mon cher enfant Mohamed Larbi.*

# Remerciements

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

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur de thèse, le Professeur **H.A. LAZOUNI** directeur de Laboratoire Des Produits Naturels (LAPRONA) Université de Tlemcen, pour ces nombreux conseils et suggestions tant scientifiques que techniques et de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie.

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur **ABDELLAH MOUSSAOUI** mon Co-encadreur de thèse, directeur du laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au Sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed Béchar, pour ses compétences scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le professeur **Harek Y.** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur le professeur **MEDDAH B.** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je suis également très honoré que Monsieur **BENMEHDI H.** ait accepté de juger et de siéger dans le jury de ma thèse.

Je remercie très chaleureusement Monsieur **SELLES C.** d'avoir accepté d'examiner ma thèse de doctorat.

Je tiens à dresser mes sincères remerciements à Monsieur **HASBELLAOUI REDHOUANE** docteur à l'université de California pour leur aide inappréciable dans la finalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier l'ensemble des enseignants chercheurs « mes frères » **N. HAMIDI, M. DJELLOULI et A. NASRI** pour son soutien moral et ses directives.

## ملخص

هذا العمل يتمحور حول الدراسة الفيتوكيميائية لأحد أنواع النباتات الطبية الصحراوية المتواجدة في الجنوب الغربي الجزائري و التي تسمى في هذه المنطقة ملفة الخادم (*Limoniastrum feei* "Plumbagenaceae") و هي من النباتات المستوطنة في هذه المنطقة. كما تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة لمستخلصاتها العضوية.

التحليل الفيتوكيميائي الذي يعتمد على استعمال الطرق الكروماتوغرافية (CC, VLC, CCM) ، الطرق الفيزيوكيميائية و الطيفية ( $^{13}\text{C}$  RMN et  $^1\text{H}$  RMN et UV, IR) للمستخلص المائي الكحولي أتاح عزل ، تنقية و تشخيص خمسة مركبات فعالة أساسية من هذه النبتة.

التأثير المضاد للبكتيريا تم تقديره بطريقة الانتشار على جيلوز (Mueller-Hinton) ، شملت الاختبارات البكتيريا التالية: (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Eischerichia coli* ) (*Citrobacterienfremotri*). بينت النتائج أن مستخلص أسنتات الاثيل لديه فعالية متوسطة ضد (*E.coli* و (*S.typhi*) و فعالية ضعيفة ضد (*S.aureus*) بينما المستخلص الكحولي أظهر فعالية جيدة ضد الأنواع البكتيرية الأربعة.

تقدير النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات: الكحولية ، ثنائي اثيل الايثر ، اسنتات الايثيل و البوتانول بطريقة الأسر بالجذور الحرة (DPPH) أظهر بأن المستخلصان أسنتات الاثيل ( $\text{IC}_{50} = 2.50$ ) و البوتانولي ( $\text{IC}_{50} = 2.52$ ) يملك قدرة مضادة للأكسدة أكبر من المستخلصات الأخرى.

*Limoniastrum feei*

الطماطم المصنوعة: ، صحراء ، ففونيدات ، سيونيزيدات ، ضد المكروبات، المضاد للأكسدة ،

## Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique d'une espèce médicinale saharienne, *Limoniastrum feei* (Plumbagenaceae), plante endémique de la région de sud-ouest algérien, ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne suivie d'une évaluation de l'activité antioxydants des extraits organiques (méthanolique, éther diéthylique, acétate d'éthyle et butanolique) de cette plante.

L'analyses phytochimiques, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques (CC, VLC et CCM) et de techniques physicochimiques et spectroscopiques (UV, IR et RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ), de l'extrait hydro-méthanolique à permet l'isolement, la purification et l'identification de cinq principaux composés actifs de cette plante.

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Eischerichia coli* et *Citrobacterien fremotri*. Les résultats mettent en évidence que l' extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité modérée contre *E.coli* et *S.typhi*, et une faible activité contre *S.aureus*. En revanche l'extrait méthanolique a présenté une bonne activité vis-à-vis des quatre bactéries.

L'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits méthanolique, éther diéthylique, acétate d'éthyle et butanolique par la méthode de piégeage de radical libre DPPH, a montré que l'extrait butanolique manifeste un pouvoir antioxydant plus grand que les autres extraits.

**Mots clés:** *Limoniastrum feei*, sahara, flavonoides, saponosides, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

## Abstract

In the continuation of the research realized by our laboratory on the bioactive substances from medicinal plants of the southeast Algeria. We have studied the chemical composition of the organic extracts (methanolic, ethyl ether, ethyl acetate and butanolic) from *Limoniastrum feei* (Plumbaginaceae), on Sahara endemic plant, used in the treatment of gastric tract.

Phytochemical and biological analysis of the hydro-methanolic extract of *Limoniastrum feei*, enabled us to find for the first time the five main active compounds of this plant, by using various chromatographic (CC, VLC, TLC) and spectroscopic (UV, IR (NMR  $^1\text{H}$ , (NMR  $^{13}\text{C}$ ) techniques.

The antimicrobial effect was determined by the agar diffusion method Mueller-Hinton tests on bacteria-Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Escherichia coli and Citrobacterien fremontii. The findings show that the ethyl acetate extract showed moderate activity against E. coli and S. typhi, and low activity against S. aureus. However the methanolic extract showed high activity towards four bacteria.

The evaluation of antioxidant activity of methanolic, ethyl ether, ethyl acetate and butanolic extracts by the method of trapping of free radical DPPH showed that the ethyl acetate ( $\text{IC}_{50} = 2.50$ ) and butanolic ( $\text{IC}_{50} = 2.52$ ) extracts show antioxidant power greater than the other extracts.

**Key words:** *Limoniastrum feei*, Sahara, flavonoids, saponosids, antimicrobial, antioxidant activity

## Abréviations et symboles

CC: Chromatographie sur Colonne ouverte

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CDCl<sub>3</sub>: chloroforme deutérié

COSY: COrrrelated SpectroscopY

CPC: Chromatographie de Partage Centrifuge

$\delta_C$ : déplacement chimique du carbone (en ppm)

$\delta_H$ : déplacement chimique du proton (en ppm)

d: doublet

DCM: dichlorométhane

dd: doublet dédoublé

ddd: doublet dédoublé dédoublé

DMPD : N, N- dimethyl- $\rho$ -phenylenediamine

DO : densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAA : équivalents d'acide ascorbique

EAG : équivalent d'acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) : concentration inhibitrice à 50 %

EI: ionisation par impact électronique (Electron Impact ionization)

ESI: ionisation par électrospray (ElectroSpray Ionization)

EtOH: éthanol

FAB: ionisation par bombardement d'atomes rapides (Fast Atom Bombardment)



Gal: galactose

GC-MS: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

(Gaz Chromatography-Mass Spectrometry)

Glc: glucose

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid

Chromatography)

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz: Hertz

J: constante de couplage

LC-MS : chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse (Liquid chromatography-Mass spectrometry)

m: multiplet

m/z: masse / charge atomique

MeOH: méthanol

MeOH-d4: méthanol tétradeutérié (RMN)

MPLC: chromatographie liquide à moyenne pression (Medium Pressure Liquid Chromatography)

MS: spectrométrie de masse (Mass Spectroscopy)

mg : Milligramme

ml : millilitre

Mn/SOD :Superoxyde dismutase dépendante du magnésium

NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NO• : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique

NO<sub>2</sub> : Dioxyde d'azote

NOS : NO Synthases

O<sub>2</sub> : Oxygène

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> : anion superoxyde

O<sub>3</sub> : Ozone

OH• : Radical hydroxyle

RMN: résonance magnétique nucléaire

RMN-<sup>13</sup>C: résonance magnétique nucléaire du carbone

RMN-<sup>1</sup>H: résonance magnétique nucléaire du proton

s: singulet

t : triplet

UV: ultraviolet

## Liste Des Figures

<b>Figure 1 :</b> Laboratoire de phytochimie au 19 <sup>ème</sup> siècle	5
<b>Figure 2:</b> Quelques structures d'alcaloïdes	7
<b>Figure 3 :</b> Quelques structures des composés phénoliques	7
<b>Figure 4 :</b> Quelques structures des terpénoïde	8
<b>Figure 5 :</b> Structure des saponines triterpéniques.	8
<b>Figure 6 :</b> Structure des saponines stéroïdes	9
<b>Figure 7 :</b> Quelques structures des molécules composant les huiles essentielles	9
<b>Figure 8 :</b> Quelques structures des glycosides	10
<b>Figure 9 :</b> Structure des aglycones cardenolides et les bufadienolides	10
<b>Figure 10:</b> Structure de base d'un flavonoïde	15
<b>Figure 11:</b> Biosynthèse des flavonoïdes	17
<b>Figure 12:</b> Les diverses classes de flavonoïdes d'après Bruneton	19
<b>Figure 13:</b> Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique	27
<b>Figure14:</b> Nomenclature utilisée pour désigner les fragments flavonoïdes	31
<b>Figure15:</b> Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones	32
<b>Figure16:</b> Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavanones	32
<b>Figure17:</b> Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavonols	32
<b>Figure18:</b> Fragmentation de la quercétine	33
<b>Figure19:</b> Clivage hétérolytique	34
<b>Figure20:</b> Clivage homolytique	34
<b>Figure 21 :</b> Morphologie générale de <i>limoniastrum feei</i>	36
<b>Figure 22:</b> Zone de distribution (région Béchar)	37
<b>Figure 23 :</b> <i>Limoniastrum feei</i> (région Béchar)	38
<b>Figure 24 :</b> Carte présentant la zone d'étude	39
<b>Figure 25:</b> Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazyle).	42
<b>Figure 26:</b> Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives	44
<b>Figure 27 :</b> Organigramme du protocole d'extraction méthanolique et séparation	50

<b>Figure 28 :</b> les différentes maladies traitées par la plante, les parties les plus utilisées et les façons de préparation	53
<b>Figure 29 :</b> Les quantités prises par jour	54
<b>Figure 30 :</b> Effet de solvant d'extraction	55
<b>Figure 31:</b> Activité antioxydante d'acide Ascorbique	57
<b>Figure 32 :</b> Activité antioxydante d'Extrait méthanolique	58
<b>Figure 33:</b> Activité antioxydante d'extrait d'éther diéthylique.	59
<b>Figure 34:</b> Activité antioxydante d'extrait d'Acétate d'Ethyle.	59
<b>Figure 35</b> Activité antioxydante d'extrait butanolique.	60
<b>Figure 36 :</b> Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml	61
<b>Figure 37:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du composé C1	78
<b>Figure 38:</b> Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du composé C1	79
<b>Figure 39:</b> Structure du composé C1	79
<b>Figure 40:</b> Spectres IR du composé C2.	80
<b>Figure 41:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du composé C2	81
<b>Figure 42:</b> Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du composé C2	81
<b>Figure 43:</b> Structure du composé C2	83
<b>Figure 44:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du composé C3	84
<b>Figure 45:</b> Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du composé C3	86
<b>Figure 46:</b> Structure du composé C3	86
<b>Figure 47:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du composé C4	87
<b>Figure 48:</b> Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du composé C4	87
<b>Figure 49:</b> Structure du composé C4	87
<b>Figure 50:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du composé C5	89
<b>Figure 51:</b> Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du composé C5	90
<b>Figure 52:</b> Structure du composé C5	90

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Quelques espèces réputées efficaces comme agents cytotoxiques.	12
<b>Tableau 2</b> : Richesse d'espèce endémique du genre <i>Limoniastrum feei</i> dans la flore du Maghreb	37
<b>Tableau 3</b> : Les masses des extraits bioactifs	54
<b>Tableau 4</b> : Résultats avec épuisement	56
<b>Tableau 5</b> : Résultats avec macération	56
<b>Tableau 6</b> : valeurs des IC50 trouvées pour les extraits de <i>Limoniastrum feei</i>	61
<b>Tableau 7</b> : résultats du test antibactérien de l'extrait méthanolique	62
<b>Tableau 8</b> : résultats du test antibactérien de l'extrait d'éther diéthylique	62
<b>Tableau 9</b> : résultats du test antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle	63
<b>Tableau 10</b> : résultats du test antibactérien de l'extrait butanolique	63
<b>Tableau 11</b> :Analyse CCM de la phase étherique (feuille)	64
<b>Tableau 12</b> : Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (feuille)	64
<b>Tableau 13</b> : Analyse CCM de la phase butanolique (feuille)	65
<b>Tableau 14</b> : Analyse CCM de la phase d'éther diéthylique (tige)	65
<b>Tableau 15</b> : Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (tige)	65
<b>Tableau 16</b> : Analyse CCM de la phase butanolique (tige)	66
<b>Tableau 17</b> : Analyse CCM de la phase étherique (Rameaux)	66
<b>Tableau 18</b> : Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (Rameaux)	67
<b>Tableau 19</b> : Analyse CCM de la phase butanolique (Rameaux)	67
<b>Tableau 20</b> : Résultats de fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle	68
<b>Tableau 21</b> : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle	69
<b>Tableau 22</b> : Résultats de fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle	70
<b>Tableau 23</b> : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle	70
<b>Tableau 24</b> : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle	71
<b>Tableau 25</b> : Résultats de fractionnement de l'extrait n-Butanol	72
<b>Tableau 26</b> : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-Butanol	73
<b>Tableau 27</b> : les bandes d'absorptions IR	74
<b>Tableau 28</b> : Résultat d'UV de composé C1	76
<b>Tableau 29</b> : Résultat d'UV de composé C2	79
<b>Tableau 29</b> : Résultat d'UV de composé C3	82
<b>Tableau 29</b> : Résultat d'UV de composé C4	85
<b>Tableau 29</b> : Résultat d'UV de composé C5	88

Dédicace	I II
Remerciement	III
صخلم	IV
Abstract	V
Résumé	VI
Liste des abréviations et symboles	IX
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XII
Sommaire	01
<b>Introduction Générale</b>	
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES</b>	04
I.1. Introduction	04
I.2. Historique	05
I.3. Phytochimie et plantes médicinales	07
I.3.1. Alcaloïdes	07
I.3.2. Composés phénoliques	08
I.3.3. Terpénoides	08
I.3.4. Saponines tritépéniques	09
I.3.5. Saponines stéroïdiques	09
I.3.6. Les huiles essentielles	10
I.3.7. Glycosides	10
I.3.8. Polysaccharides	11
I.4. Bio activité des métabolites secondaires des végétaux	11
I.4.1. agents antimicrobiens	12
I.4. 2. agents cytotoxiques	13
I.4. 3. Autres activités	13
I.5. Conclusion	
<b>Chapitre II : METHODES D'EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES</b>	
<b>FLAVONOIDES</b>	14
II.1. Introduction	14
II.2. Les flavonoides	14
II.2.1. Historique	

II.2.2. Structure chimique et classification	15
II.2.3. La biosynthèse	15
II.2.4. Sources	18
II.2.5. Classes de flavonoïdes	18
II.2.6. Le rôle des flavonoïdes dans les plantes	19
II.2.7. Importance dans l'alimentation	20
II.2.8. L'importance dans l'industrie cosmétique	20
II.2.9. Propriétés chimique et biologiques des flavonoïdes	20
II.2.9. a. Les radicaux libres	21
II.2.9. b. Les antioxydants un mécanisme de défense naturelle dans les organismes vivants	21
II.3. Méthodes d'extractions des flavonoïdes	22
II.3.1. Généralité	22
a. Extraction par solvants	22
b. Extraction par micro-onde	22
II.3.2. Extraction des flavonoïdes	21
II.4 Méthodes d'identifications des flavonoïdes	26
II.4.1. La spectroscopie UV-visible	27
II.4.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	29
II.4.2- a. RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)	29
II.4.2-b. RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)	29
II.4.2.c. Corrélations homonucléaires	30
II.4.2.d. Corrélations hétéronucléaires	30
II.4.3. La spectrométrie de masse (SM)	30
II.5. Conclusion	34

## **Partie Expérimentale**

### **Chapitre III : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

III.1. Introduction	36
III.2. Classification botanique de la plante	36
III.3. Etude Ethnopharmacologique	38
III.5. Criblage phytochimique	39
III.5.1. Matériel végétal	39
III.5.2. Produit végétale épuisé avec l'HCl dilué	39

III.5.3. Produit végétale épuisé avec l'eau distillée	40
III.5.4. Produit végétale épuisé avec l'éthanol 50%	40
III.5.5. Produit végétale épuisé avec le chloroforme	40
III.5.6. Produit végétale macéré avec l'éthanol 70%	40
III.5.7. Produit végétale macéré avec l'HCl dilué	41
IV-1- Activité antioxydant	41
IV-1- 1- Définition des antioxydants	41
IV-1- 2- Principe de la méthode	42
1. Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant	42
2. Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives :	43
3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques :	43
Test antioxydant	44
a-Protocole	44
b-Pouvoir antioxydant par test au DPPH	45
Matériels utilisés	45
Préparation de l'extrait à tester	45
Préparation de solution de DPPH dans le méthanol	45
Protocole du pouvoir antioxydant	45
c-Evaluation de l'activité antioxydant	46
Test qualitatif HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).	46
2-Test antioxydant par quantification spectrophotométrique	46
IV-2- Activité antibactérienne	47
IV-2-1-Repiquage des espèces bactériennes	47
IV-2-2-Préparation de l'inoculum	47
IV-2-3-Préparation des disques	47
IV-2-4-Mueller-Hinton	47
Préparation des milieux de culture	47
IV-2-5-Ensemencement	48
IV-2-6-Lecture :	48
Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne :	48
IV-2. Investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Limoniastrum feei</i>	49
IV-2.1. Protocole d'extraction	50
Stratégie de séparation	51



**Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION**

Introduction	52
1- Etude Ethnopharmacologique	52
1.1- Résultats d'enquête ethnopharmacologique	52
2- Résultats du Criblage phytochimique	54
3. Résultat d'activité antioxydant	57
Activité antimicrobienne	62
Lecture de résultat	62
IV-2. Investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Limoniastrum feei</i>	64
IV-2.2. Résultat d'extraction des feuilles	64
a. phase d'éther diéthylique	64
b. phase d'acétate d'éthyle	64
c. phase buthanolique	65
IV.2.3. Résultat d'extraction des tiges	65
a. phase d'éther diéthylique	65
b. phase d'acétate d'éthyle	65
c. phase buthanolique	66
IV.2.4. Résultat d'extraction des rameaux	66
a. phase d'éther diéthylique	66
b. phase d'acétate d'éthyle	66
c. phase buthanolique	67
Stratégie de séparation	68
I.3. Fractionnement et isolement des composés	68
I.3.1. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait Acétate d'éthyle partie Tige.	68
I.3.2. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait Acétate d'éthyle partie feuille.	70
I.3.3. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait n-Butanol partie Rameaux	72
II. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés	73
IV-4. 2. Spectrophotométrie Infra-Rouge (IR-TF)	73
II.1. Elucidation de la structure du composé C1	76
II.1.a. Propriétés physico-chimiques	76
II.1.b. Données spectroscopiques	76

II.1. Elucidation de la structure du composé C2	79
II.1.a. Propriétés physico-chimiques	79
II.1.b. Données spectroscopiques	79
II.1. Elucidation de la structure du composé C3	82
II.1.a. Propriétés physico-chimiques	82
II.1.b. Données spectroscopiques	82
II.1. Elucidation de la structure du composé C4	85
II.1.a. Propriétés physico-chimiques	85
II.1.b. Données spectroscopiques	85
II.1. Elucidation de la structure du composé C4	88
II.1.a. Propriétés physico-chimiques	88
II.1.b. Données spectroscopiques	88
II.6. Conclusion	91
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	92
<b>BIBLIOGRAPHIE.</b>	



***INTRODUCTION  
GENERALE***

## **Introduction générale**

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a utilisé des plantes, d'abord pour se nourrir, puis pour se soigner. Après de nombreux tâtonnements successifs au cours des siècles, une première distinction a pu être faite entre plantes comestibles et plantes toxiques. Au cours du temps, d'autres constatations ont permis de sélectionner les plantes servant à soigner des maladies. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicament. Jusqu'au début du xx<sup>ème</sup> siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale [1].

L'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes brutes ou préparées s'est considérablement élargie. L'organisation mondiale de la santé (L'OMS) estime que 80% de la population globale dépend notamment de la médecine traditionnelle pour les soins sanitaires et, il a été rapporté aussi que 51% des préparations médicamenteuses dans les pays industrialisés dérivent de plantes ; ces dernières agissant comme sources d'agents thérapeutiques modèles pour de nouveaux composés synthétiques ou comme matière de base pour la production semi synthétique de molécules de haute complexité [2].

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères.

Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier [3].

Le médicament à base de plantes est un "complexe" de molécules, issu d'une ou plusieurs espèces végétales. De nombreuses formes galéniques sont aujourd'hui proposées, certaines plus innovantes que d'autres, laissant l'infusion originelle plus ou moins désuète. Pourtant ces changements de forme peuvent parfois cacher des modifications quant à l'action sur le métabolisme ou la biodisponibilité des principes actifs.

La première étape de la découverte d'un nouveau médicament est la mise en évidence d'un « principe actif ». Depuis des milliers d'années, l'homme sait trouver dans la nature et souvent dans le règne végétal les moyens pour se soigner.

Actuellement, les extraits de plantes et les préparations analogues ne peuvent plus être considérés comme de vrais « médicaments » pour lesquels sont exigées une identification rigoureuse et une très grande pureté [4].

Dans une logique de stratégie des études des plantes médicinales ; la valorisation ne s'arrête pas uniquement au niveau des connaissances ethnopharmacologiques et biologiques des plantes, mais l'étude phytochimique est obligatoire pour cerner l'ensemble des informations nécessaire à la valorisation.

L'Algérie, pays connu par ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques [5].

L'objectif de notre contribution à ce travail de recherche consiste à la valorisation de la flore de la région aride de sud-ouest algérien par la recherche de composés qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique. Pour cela, une plante de la famille *Blombaginaceae* à savoir *Limoniastrum Feei* (MlefetKhadem) fait l'objet de notre étude.

La première partie de l'étude renferme deux chapitres. Le premier consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle est présentée l'utilisation des activités biologiques (antimicrobienne et cytotoxique) des plantes médicinales et, dans le deuxième nous développons une mise au point exhaustive sur les méthodes d'extractions et d'identifications des flavonoïdes.

Le deuxième volet de notre travail concerne la partie expérimentale (troisième chapitre) qui renferme également une étude botanique de *Limoniastrum feei* ainsi que les techniques d'isolement et d'analyse utilisées au cours de ce travail. Il sera présenté l'extraction des trois parties de la plante, les protocoles utilisés au cours des tests biologiques et antioxydants ainsi que la détermination structurale des composés isolés.

Enfin le quatrième chapitre de l'étude est consacré à la présentation des résultats et de leur discussion.

Une conclusion générale viendra achever le présent travail dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées.

---

# *Synthèse Bibliographique*

## *Chapitre I Utilisation des plantes médicinales*

## **I- 1. Introduction**

Selon Pifferi et Vitali (1993), les deux dernières décennies ont été caractérisées par une résurgence d'intérêt pour le développement des nouveaux médicaments à partir de plantes, non seulement comme appel au secours à la phytothérapie alternative ou comme partie de ce qu'on appelle « green fashion », mais principalement grâce au progrès des technologies d'isolation, à l'instrumentation analytique et aux traitements informatisés des données qui ont contribué significativement dans la réduction du scepticisme des remèdes à base de plantes [6].

## **I-2. Historique**

L'utilisation des plantes remonte pratiquement au commencement de l'humanité. Sans techniques ni connaissances, les plantes cueillies constituaient la seule nourriture (en plus du gibier) et le seul moyen de se soigner.

Les plantes ont toujours été au cœur de nos vies. Le monde végétal nous fournit les aliments que nous mangeons et l'oxygène que nous respirons. Il n'est guère surprenant qu'il nous apporte aussi les remèdes pour soigner les maux de tous les jours, des remèdes que les cultures du monde entier ont utilisés depuis des milliers d'années.

A cet égard, nous devons beaucoup à nos ancêtres. En effet, leur savoir sur l'usage efficace des aliments et des plantes en guise de médicaments a traversé les générations, nous offrant ainsi un riche héritage de remèdes végétaux. Les plus anciens vestiges de la médecine à base de plantes, en Chine, remontent aux environs de 2500 ans av. J.-C. Le papyrus d'Ebers en Égypte, qui date d'environ 1500 av. J.-C., mentionne plus de sept cents plantes médicinales dont un grand nombre sont encore populaires de nos jours. Nous savons que plusieurs autres peuples, notamment les Grecs, les Perses, les Indiens et les Aztèques utilisaient des plantes médicinales au-delà de l'an 1000 av. J.C [6,7].

Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie comme Abu Bakr al-Razi (865-925) qui fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie et Ibn Sina (980-1037) qui écrivit une œuvre intitulée « Canon Eteb » et qui reprit et compila les doctrines d'Hippocrate et de Galien. Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Mais le plus grand d'entre eux fut sans aucun doute Ibn al Baytar (1197-1248). Né à Malaga, il émigra en Orient où il rédigea le très complet « El Jami les mofradate



El Adwya wa Aghdia » (Somme des Simples). Ce livre contient une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont plus de 300 plantes furent citées pour la première fois. Ce sont les Arabes qui ont donné à la pharmacie son caractère scientifique. Les traditions pharmaceutiques arabes sont passées en Europe et ont influencé profondément les grandes universités de l'époque du 9<sup>ème</sup> siècle [7].

Les progrès scientifiques et techniques permettent d'expliquer précisément les effets médicaux des plantes. On extrait des principes actifs (molécules) de certaines plantes pour fabriquer des médicaments (exemple: l'aspirine est extraite de l'écorce du saule). Aujourd'hui encore, une grande partie de nos médicaments sont élaborés à base de plantes [8,9].

### I-3 Phytochimie et plantes médicinales

Ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle que l'homme a commencé à isoler les principes actifs des plantes médicinales dont un des exemples le plus frappant est la découverte de la quinine de l'écorce de quinquina par Caventou et Pelletier. De telles découvertes ont mené à un intérêt pour les plantes à partir du nouveau monde et les expéditions ont récuré les jungles et les forêts presque impénétrables à la recherche pour les nouvelles médecines. Ces expéditions duraient pendant des années et ne prenaient fin que lorsque les plantes soient arrivées en laboratoires de phytochimie (fig. 1) qui sont devenus des centres remarquables dans les études des plantes médicinales. Des années de travail très dur étaient en général récompensées par l'isolement de nombreux composés qui étaient bien accueillis par les experts et par les compagnies pharmaceutiques qui prenaient rapidement de l'extension [10].

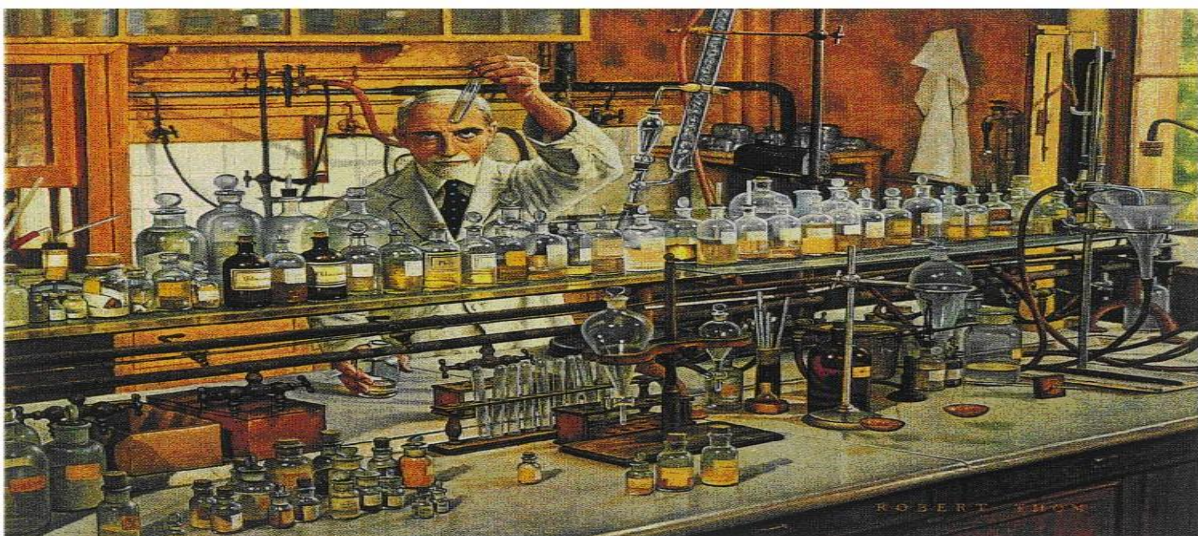


Fig - 1 : Laboratoire de phytochimie au 19<sup>ème</sup> siècle [10].

En biochimie végétale, il est connu que les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à basse molécularité appelées métabolites primaires comme les saccharides (sucres), les acides gras et les acides aminés suivies de la classe des métabolites secondaires qui renferment en général des vertus thérapeutiques [11, 12].

Nous notons à travers la bibliographie qu'une des singularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Le fait que ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces, indique qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général et qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal : ce sont les métabolites secondaires.

Dans leur environnement et par leurs métabolites secondaires, les plantes constituent une source de guérison de maladies ainsi qu'un moyen de défense et de coévolution pour les insectes par attraction et répulsion, comme ils favorisent ou inhibent l'existence de ses semblables par action allélopathique [13].

En fait, les métabolites secondaires sont les outils principaux de coévolution plantes-êtres vivants ce qui, pour répondre aux multiples facettes de celle-ci, a donné lieu à une extrême diversification de ces composés [14].

Cette coévolution s'applique à tous les niveaux d'organisation du vivant, allant des bactéries aux champignons et des insectes aux mammifères et s'exprime à tous les stades du développement de la plante partant de la graine à la fleur par l'appareil végétatif et au travers de tous les biotopes. La lutte contre les champignons parasites repose également en grande partie sur les métabolites secondaires. Beaucoup de plantes répondent à une invasion fongique en produisant des substances inhibant la croissance du parasite. Il peut s'agir de l'augmentation de la synthèse de produits déjà existants comme les lignines, les tanins, les composés phénoliques, la juglone...

Cette diversité (au moins 30 000 structures caractérisées), fruit de la coévolution, s'explique par:

- la relation la liant avec les trois grandes classes de métabolites primaires,
- le fait que les métabolites secondaires subissent, peu ou pas, le filtre de la sélection, laquelle ne retient au niveau du métabolisme primaire que les molécules les plus performantes.
- la grande variété des motifs chimiques [14].

### I-3.1. Alcaloïdes

Selon les structures de leurs hétérocycles (fig.2), les alcaloïdes sont des dérivés de la pyrrolidine, la pyridine, la pipéridine, la quinoline, l'isoquinoline, l'indole, la tropane, la quinolizidine, la purine, etc.... Les alcaloïdes sont représentés par des complexes simples, ou même des composés polycycliques de hauts poids moléculaires. Il y a plus de 10 000 alcaloïdes connus [11, 15,16].

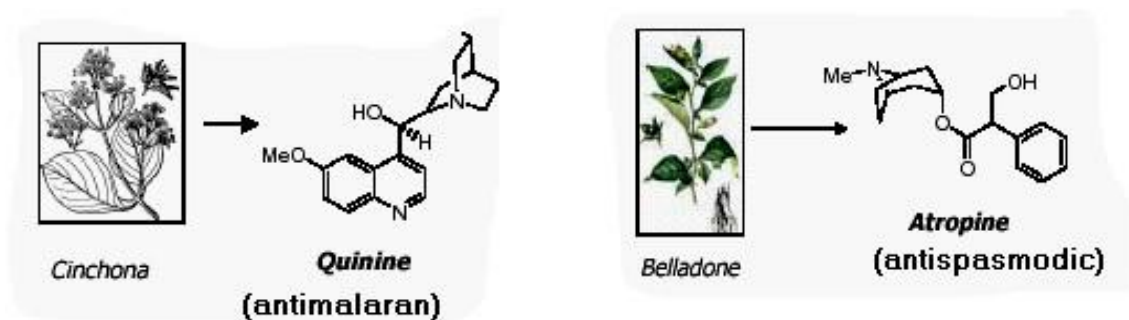


Figure 2: Quelques structures d'alcaloïdes

### I-3.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ont des compositions chimiques diverses et sont abondants dans les plantes. Ils se composent d'un ou de plusieurs cycles aromatiques à savoir en C6 (les composés phénoliques les plus simples), en C6-C1 (acides hydroxybenzoïques et leurs dérivés), en C6-C3 (phenylpropanoïdes, acides hydroxycinnamiques, umbelliférol et ligands), en C6-C3-C6 (flavonoïdes y compris flavonones, flavones, flavonoles, catéchols, leuco anthocyanidines, anthocyanines, anthraquinones, etc.) (fig.3) et de composés phénoliques polymériques (les tanins) [17, 11].

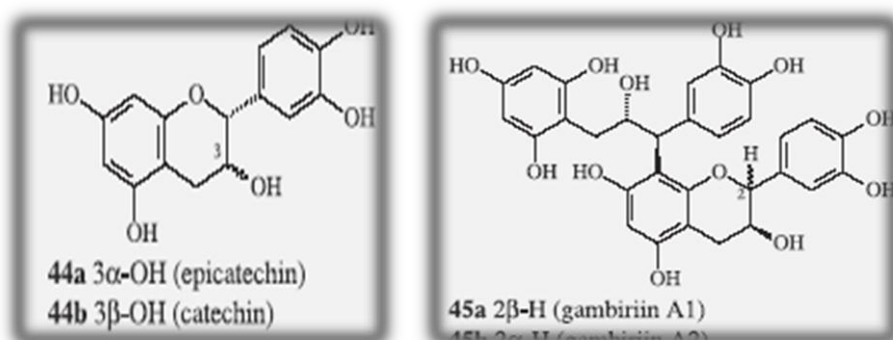


Fig - 3 : Quelques structures des composés phénoliques

### I-3.3. Terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent une classe importante de plus de 10000 composés qui déterminent également l'activité pharmacologique des plantes médicinales. Selon le nombre de groupes d'isoprénoïde ( $C_5H_8$ ), les terpénoïdes sont divisés en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, tetraterpènes, polyterpènes. Ces composés ont de diverses applications. Quelques polyterpènes sont des composants auxiliaires (le caoutchouc et le gutta-percha). Les diterpènes et les tetraterpènes représentés par des vitamines et des provitamines sont les composants principaux des produits alimentaires et médicinaux. Les triterpènes jouent le rôle des aglycones (sapogénines) dans la composition des saponines de triterpènes et sont largement répandus dans la pratique médicale [11,18].

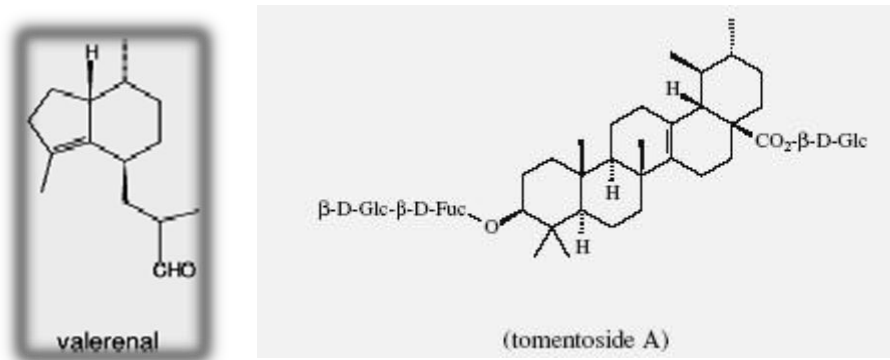


Fig - 4 : Quelques structures des terpénoïde

### I-3.4. Saponines triterpéniques

Les saponines triterpéniques dérivent principalement de cycloartane, de dammarane, d' $\alpha$ -amirin et de  $\beta$ -amirin (les dérivés de dammarane incluent les saponines du ginseng "Panax ginseng" et ceux de  $\beta$ -amirin sont représentés par les saponines du licorice "Glycyrrhiza glabra L." largement employés dans des pratiques médicales) [11,12].

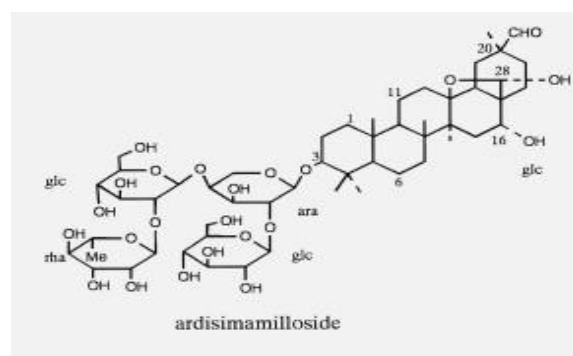


Fig - 5 : Structure des saponines triterpéniques.

### I-3.5. Saponines stéroïdiques

Les saponines stéroïdiques sont d'une importance médicale considérable. En effet, le Diosgenin isolé à partir des racines de "dioscorea deltoidea" ou de celles de "dioscorea nipponica" représente la matière première principale pour la fabrication des drogues hormonales (cortisone, hydrocortisone, prednisolone, prednisone, etc....) largement répandues pour le traitement de l'arthrite, du tendovaginitis, du blepharitis, du keratitis et de l'iritis et sert également à traiter les maladies virales et fongiques [19]. Actuellement, les demandes du diosgenin sont chiffrées à des centaines de milliers de tonnes métriques par an. Par conséquent, la recherche de nouvelles sources des stéroïdes à partir des plantes (tels que le night shade de laciniata, le solanum laciniatum Ait e.) est un problème très pressant [11].

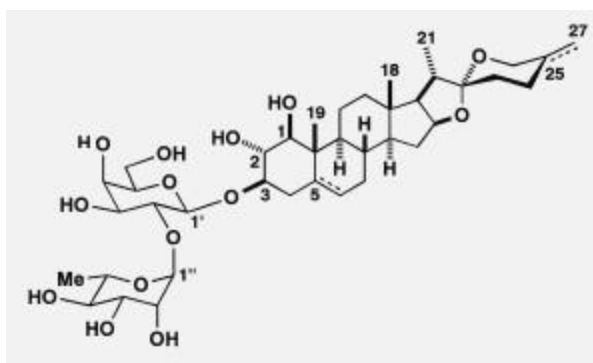


Fig - 6 : Structure des saponines stéroïdes

### I-3.6. Huiles essentielles

Les plantes contenant les huiles essentielles appelées plantes aromatiques sont très importantes dans la pratique médicale. Les huiles essentielles sont des mélanges de plusieurs composants complexes des substances volatiles parfumées, des monoterpènes, des sesquiterpènes, des composés aromatiques, et de leurs dérivés. L'huile essentielle peut contenir des centaines de composants. Les huiles essentielles produisent des effets astringents, bactéricides, et anti-inflammatoires [12].

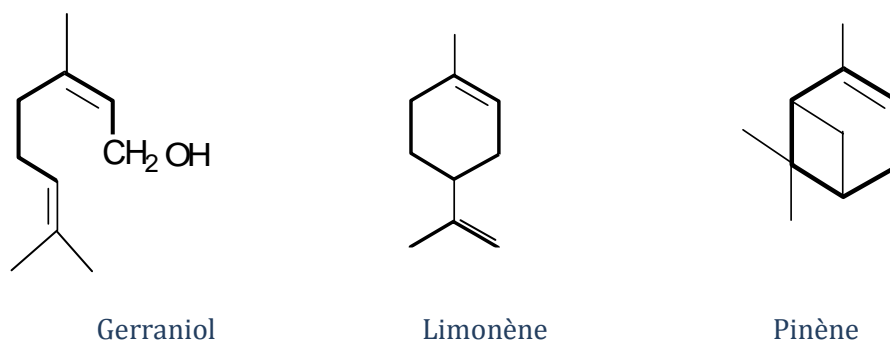


Fig - 7 : Quelques structures des molécules composant les huiles essentielles

### 3.7. Glycosides

Les glycosides sont présents dans la plupart des plantes médicinales. Selon la nature de leurs aglycones, les glycosides sont divisés en glycosides cardiaques, anthraglycosides, iridoïdes (glycosides amers), glycosides, thioglycosides, et isothiocyanates cyanogéniques. Les glycosides cardiaques induisent des effets spécifiques forts sur le myocarde et augmentent la force des contractions cardiaques [11, 12].

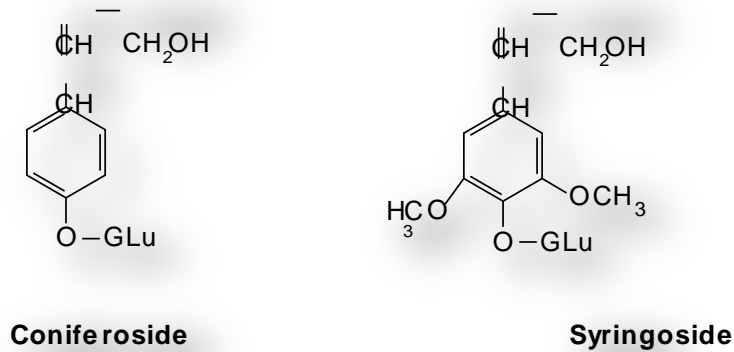


Fig - 8 : Quelques structures des glycosides

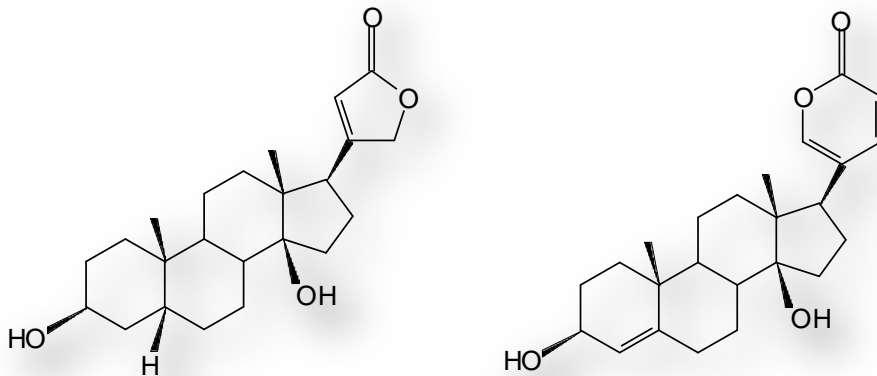


Fig - 9 : Structure des aglycones cardenolides et les bufadienolides

### I-3.8. Polysaccharides

Les pectines, les résines ainsi que les mucilages sont les polysaccharides principaux utilisés dans la pratique médicale. Les pectines servent d'émulsifiants et de stabilisateurs, constituent les composants principaux des onguents avec des acides salicyliques et boriques et décrivent la composition du contenu de cholestérol dans le sang et le métabolisme de modulation d'acide de

bile. Des résines sont utilisées pour la production des émulsions d'huile, des solutions mucilagineuses et des liquides de remplacement de sang [11].

#### **I-4. Bio activité des métabolites secondaires des végétaux**

L'activité biologique des métabolites secondaires extraits de la plante est loin d'avoir été détrônée par la chimie de synthèse comme il avait été prédit dans la premier partie de ce siècle. En effet, l'usage de ces substances végétales connaît depuis plusieurs décennies un renouveau remarquable comme le montrent les nombreuses publications scientifiques parues à travers le monde.

Nous vous présentons dans les pages qui suivent les résultats de quelques études faites sur différentes espèces et, qui montrent la diversité des activités pharmacologiques des plantes médicinales.

##### **I-4.1. Agents antimicrobiens**

La découverte et le développement des agents antibiotiques sont parmi les plus importantes réussites de la science moderne et de la technologie pour le contrôle des maladies infectieuses. Cependant, les accroissances microbiennes et leurs propagations chez plusieurs souches a réduit l'efficacité de plusieurs médicaments. L'étude des plantes médicinales comme agents antimicrobiens est devenue donc nécessaire. En effet, l'activité des extraits de plantes sur les bactéries et les champignons a été exploitée par plusieurs chercheurs [20,21].

L'auteur J. Villagomez- Ibarra et coll (2001) montre l'action antimicrobienne des extraits méthanolique, hexanoique et d'acétate d'éthyle d'une espèce *Gnaphalium* riche en diterpènes et flavonoides [22].

A.S.Okoli et coll (2002) ont testé l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux du *Harungana madagascariensis*, espèce riche en métabolites secondaires tels que : les glucosides, tanins, saponins, flavonoides et alcaloïdes dont ils ont remarqué une forte activité [23].

A. Iqbal et coll (1998) ont montré les propriétés antimicrobiennes des extrais aqueux et hexanoique de 82 plantes médicinales originaires d'Inde [24].

L'action antimicrobienne de cinq plantes médicinales originaires d'Argentine, riches en flavonoides, a été menée par N. E. Hernandez et coll (2000) qui ont décelé une forte activité lors de cette etude [25].

N. Hamidi (2014) a montré l'activité antimicrobienne des extraits organiques de la plante saharienne : *Fagonia Longispina* [26].

La résistance des bactéries aux extraits de plantes a aussi été étudiée. En effet, le travail de Y. Kumorasamy et coll (2002) portant sur l'action antimicrobienne de 21 espèces appartenant à 14 familles de plantes différentes, était présente pour les extraits hexane, DCM et méthanol [27].

Citons aussi les travaux de Musachache et coll (2005) qui montrent que l'activité antimicrobienne de *Erythrina Latissima* était riche en flavonoides [28].

L'activité antivirale a aussi été étudiée bien qu'elle soit moins exploitée que les actions antimicrobienne et antifongique. Citons à titre exemple, l'étude de V. Kolt et coll (1999) réalisées sur des espèces médicinales originaires d'Argentine et dont l'activité antivirale a été discutée [29].

#### I-4. 2. Agents cytotoxiques

Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'efficacité des plantes médicinales et les substances qui en dérivent contre les tumeurs.

Le tableau ci-dessous présente quelques espèces réputées efficaces comme agents cytotoxiques et les principaux constituants qu'elles contiennent.

**Tableau 1** - Quelques espèces réputées efficaces comme agents cytotoxiques.

Espèce	Constituants majoritaires	Référence
<i>Artocarpus champeden</i>	flavones	[30]
<i>Cirsium tenoreanum</i>	flavonoides	[31]
<i>Cestrum sendtenerianum</i>	saponins stéroïdes	[32]
<i>Viguiera decurrens</i>	saponins	[33]
<i>Scurrula ferruginea</i> ( <i>Loranthaceae</i> )	flavonoides	[34]
<i>Vismia guianensis</i>	composés aromatiques	[35]
<i>medicinal plant in Tanzanian</i>	-	[36]
<i>Typhonium flagelliforme</i> ( <i>Araceace</i> )	-	[37]
<i>Ivorian plants</i>	-	[38]



### **I-4. 3. Autres activités**

Les activités biologiques déjà citées ne représentent qu'une maigre partie de la gamme des propriétés pharmacologiques attribuées aux plantes.

Parmi les études multiples qui attestent de l'impact positif des métabolites secondaires des plantes, citons celle de J. Addae-Kyerem et coll (2001) qui ont montré la présence de l'activité antiplasmodique d'une espèce riche en alcaloïdes appelée *Pleiocarpa mutica* [39]. Aussi, d'autres travaux comme ceux de:

- B. k. Rao et coll (2003) ont montré l'action antidiabétique de l'extrait éthanolique du *Teminolia pallida* [40].
- N.S.Sangwan et coll (1998) ont mis au point le potentiel antimutagène de métabolites secondaires [41].
- J. B. Calixto et coll (2000) ont prouvé l'action analgésique des produits naturels tirés de plantes dans une mise au point détaillée dont figurent plusieurs espèces [42].

### **I-5. Conclusion**

La médecine traditionnelle est pratiquée depuis l'origine de l'humanité. Par tâtonnements successifs, les êtres humains ont peu à peu trouvé des moyens de soulager la douleur, de soigner la maladie et de vivre en harmonie avec la nature.

Les plantes médicinales représentent justement un composant important dans les médicaments traditionnels. Dans le présent, comme dans le passé les plantes médicinales jouent un rôle très important dans le système d'hygiène primaire.

Dans leur environnement et par leurs métabolites secondaires, les plantes constituent une source de guérison de maladies ainsi qu'un moyen de défense, de coévolution pour les insectes, par attraction et répulsion, comme ils favorisent ou inhibent l'existence de ses semblables par action allélopathique.

Cette vie écologique de la plante dans son biotope, à permis la biosynthèse de diverses substances primaire et secondaire ayant un intérêt important dans la vie de l'être humain.

# *Synthèse Bibliographique*

## *Chapitre II Méthodes D'extraction Et Identification Des Flavonoïdes*

## II-1. Introduction

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Mais il existe une exclusivité du monde végétal appelé métabolisme secondaire.

Ces produits, à structures chimiques souvent complexes, sont très dispersés et très différents selon les espèces. Parmi ces composés figurent les saponosides et polyphénols qui jouent un rôle de défense et protègent la plante contre les attaques de prédateurs herbivores et insectes. C'est seulement à partir de la deuxième moitié du 20<sup>e</sup> siècle qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution de techniques d'analyses [43 - 44].

Dans ce chapitre, nous aborderons les techniques d'extraction et d'identification des métabolites secondaires, mais nous nous limiterons plus particulièrement aux flavonoides.

Ce choix sur ces deux classes des substances naturelles a été fixé, au cours des travaux préliminaires de criblage phytochimique réalisé au laboratoire [45,46].

## II-2. Les flavonoides

Les flavonoides (du Latin flavus, jaune) sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux et qui se trouvent dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes [47].

Les flavonoides (plusieurs milliers de molécules décrites) sont largement présents mais pratiquement absents chez les algues. Ils font leur apparition chez les mousses.

Chez lesougères et les conifères, leur variété structurale est encore faible mais maximale chez les plantes à fleurs. Présents dans les cellules épidermiques, ils protègent les plantes terrestres des radiations ultraviolettes [4,48].

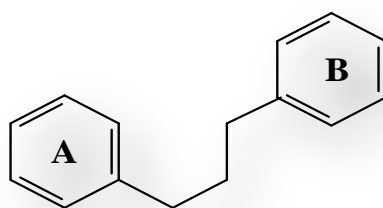
### II-2.1. Historique

Les flavonoïdes n'ont pris leur essor dans la pharmacopée occidentale que depuis quelques années, même si leur biodisponibilité n'est pas encore complètement élucidée. Ils ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814 mais réellement découverts en 1937 par **Albert Szent-Györgyi** qui mit en exergue leur influence pour

réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce scientifique hongrois reçut le prix Nobel pour ses recherches sur la vitamine C et les propriétés biochimiques des flavonoïdes [49].

### II-2.2. Structure chimique et classification

De nos jours, plus de 4 000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Figure 10) [50].



**Figure 10:** Structure de base d'un flavonoïde

### II-2.3. La biosynthèse

Leur biosynthèse (Figure 11) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6' - tétrahydroxychalcone à partir de laquelle on différencie les 4-oxo-flavonoïdes, les anthocyanidines et les flavanes [51]

- La chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'une enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1): naringénine.
- C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2): apigénine ou le dihydroflavonol (3): (2R, 3R)- dihydrokaempférol respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3.
- Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4): kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5): leucoanthocyanidol, respectivement.

- Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7).
- Le pélagonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8): pélagonidol-3-glucoside.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

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

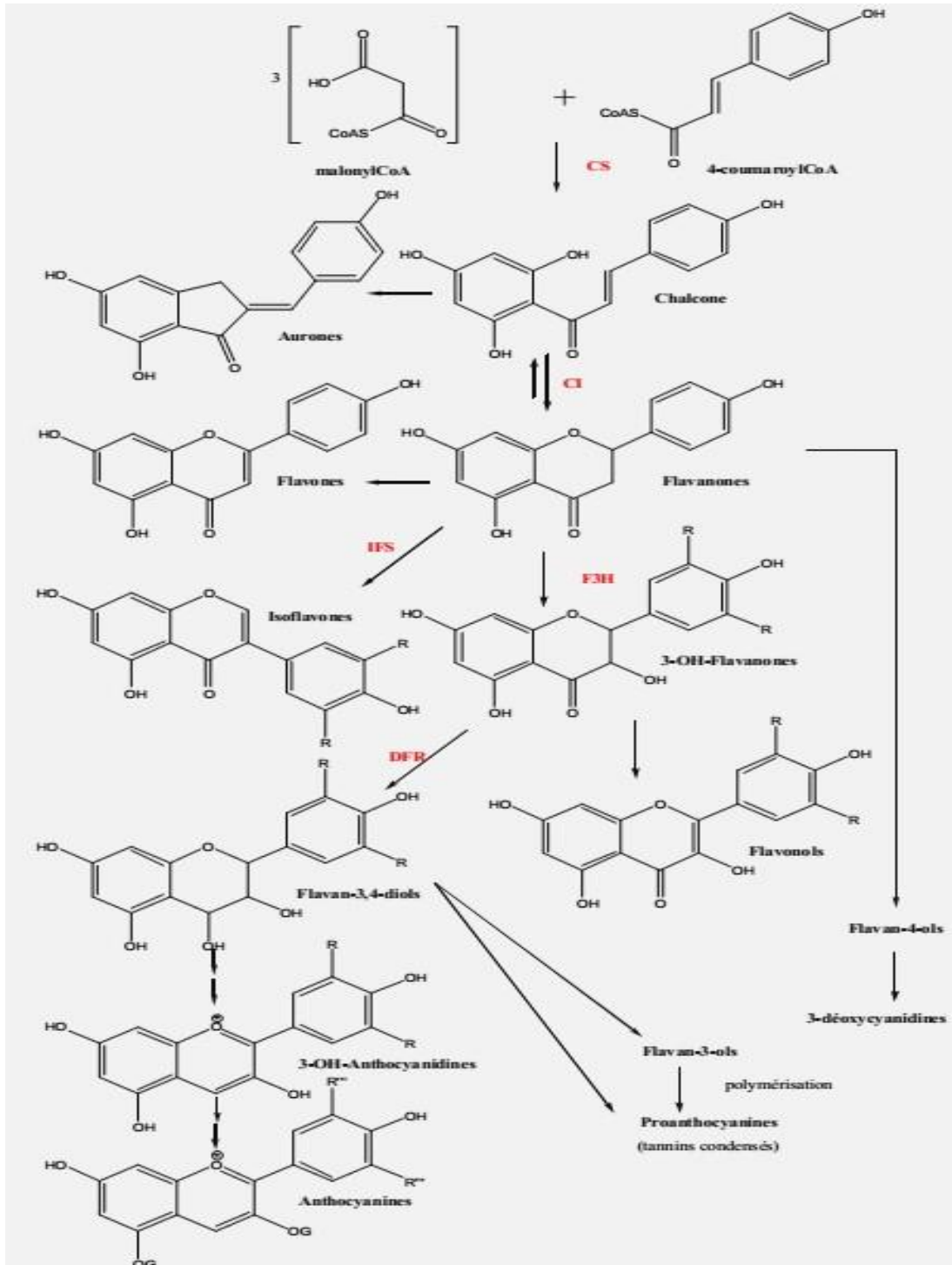


Figure 11: Biosynthèse des flavonoïdes [50].

**CS**: chalcone synthase , **CI**: chalcone isomérase , **F3H**: Flavanone 3-hydroxylase ,  
**IFS**: isoflavone synthase , **DRF**: dihydroflavonol reductase , **FS** :flavonol synthase ,  
**AS**: anthocyanin synthase, **R**=-H, -OH ou -OCH<sub>3</sub> et **OG** = -O-sucrose

## II-2. 4. Sources

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs.

Par contre, on les trouve en abondance dans les familles suivantes:

- Polygonacees
- Apiacees (= Ombellifères)
- Rutacees
- Asteracees (= Composées)
- Légumineuses

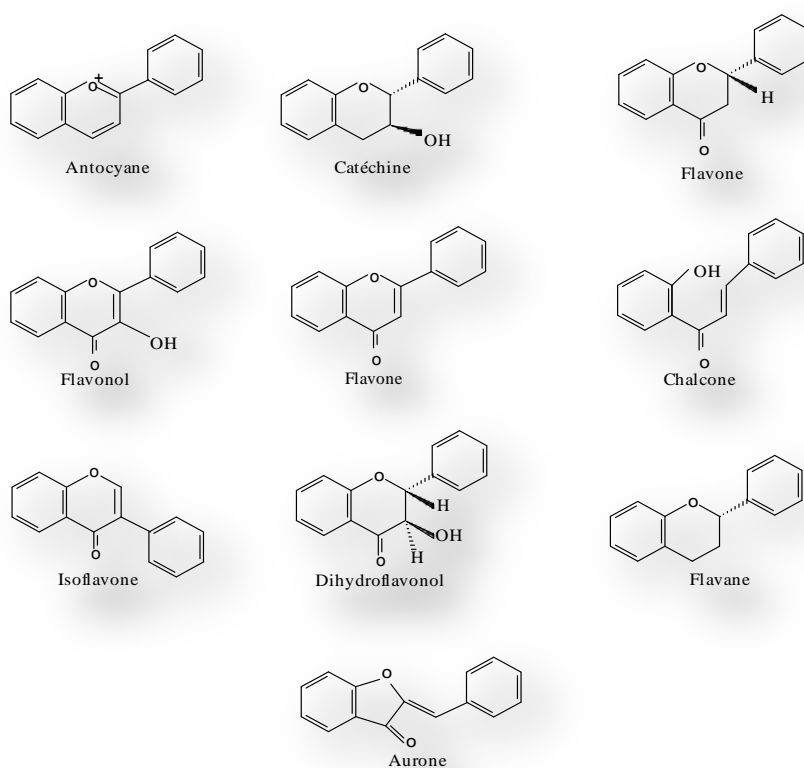
De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles, permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines.

Il est à noter que flavonones et flavones sont souvent présentes dans la même plante. Flavones et flavonols ne se trouvent généralement pas ensemble, pas plus que les flavanols et les anthocyanes [4,52].

## II-2.5. Classes de flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (Figure 12), nous citerons les principales: anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols [53].

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, ils sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat à la position d'osylation [50, 52].



**Figur 12:** Les diverses classes de flavonoïdes d'après Bruneton

## II-2. 6. Le role des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits), des aurones et des chalcones. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les



interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines) [52, 54].

### **II-2. 7. Importance dans l'alimentation**

L'importance des légumes, des fruits, des légumineuses et des baies pour une alimentation saine est incontestable. L'une des raisons possibles pour lesquelles ils présentent des caractéristiques favorisant une bonne santé, est la présence de différents antioxydants dans les plantes comestibles tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, le sélénium, les folates et les composés phénoliques y compris les flavonoïdes. Les caroténoïdes, le sélénium, les folates et les vitamines C et E sont des nutriments, alors que les flavonoïdes et autres composés végétaux similaires ne sont pas importants sur le plan nutritionnel, mais peuvent, par exemple, avoir un rôle significatif dans le système de défense antioxydant du corps humain [55].

### **II-2. 8. L'importance dans l'industrie cosmétique**

Pour lutter plus efficacement contre la production de radicaux libres néfastes à la santé et à la beauté de la peau, les laboratoires pharmaceutiques ont mis au point des cosmétiques contenant des polyphénols aux propriétés antioxydantes à la fois pour leur fonction de régulation et de conservation et également pour leur action anti-inflammatoire.

On peut trouver sur le marché un hydratant corporel qui renferme de l'extrait de pépin de raisin et de l'extrait d'écorce de pin. Les proanthocyanidines contenues dans ces extraits ont été stabilisées pour maximiser leur potentiel. Quant à l'extrait de thé vert, il contribue à réduire les effets nocifs de l'exposition au rayon UV et réduit l'inflammation cutanée [56].

### **II-2. 9. Propriétés chimique et biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont essentiellement préconisés pour leur action antioxydante, contribuant à protéger ainsi l'organisme des méfaits liés à la pollution, à l'ingestion de substances toxiques (alcool, tabac...), à l'exposition au soleil, ... , responsables du vieillissement cellulaire et de la sénescence.

Si les radicaux libres sont produits naturellement par l'organisme pour lutter contre les bactéries et les virus, ils peuvent aussi, dans certains cas, être produits en excès et

dégrader les parois des cellules, les protéines ou l'ADN. C'est à ce moment que les antioxydants interviennent et trouvent toute leur raison d'être [57].

#### **a. Les radicaux libres**

Ce sont des atomes ou un groupe d'atomes avec un nombre impair d'électrons sur la loge extérieure et qui peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules. Les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN ou la membrane cellulaire. Suite à une exposition aux radicaux libres, il peut se produire une prolifération (multiplication anormale) des cellules, entraînant un cancer, un dysfonctionnement cellulaire ou la mort des cellules [53, 58].

#### **b. Les antioxydants un mécanisme de défense naturelle dans les organismes vivants**

Ce sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre et, par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes [59].

Les mécanismes de défense anti-oxydante du corps humain peuvent être divisés en deux catégories différentes. Premièrement, un certain nombre d'enzymes sont synthétisées à partir des protéines et d'autres nutriments et constituants de l'organisme. Quant au second groupe d'antioxydants, il doit être obtenu à partir de l'alimentation, puisque ces derniers ne peuvent être synthétisés par l'être humain. Ils comprennent les nutriments et les métabolites végétaux mentionnés plus haut à savoir les vitamines E et C, les caroténoïdes, le sélénium, les folates, les flavonoïdes, les phytoestrogènes et les glucosinolates [4,53, 60].

## **II-3. Méthodes d'extractions des flavonoides**

### **II-3.1. Généralités**

L'isolation d'une substance naturelle ou synthétique nécessite souvent une extraction avec un solvant organique ou minéral approprié, à froid, à chaud ou par micro-onde.

#### **a. Extraction par solvants**

L'extraction par solvants est habituellement employée pour récupérer un composant d'un solide ou d'un liquide. L'échantillon entre en contact avec le solvant qui dissout les corps susceptible d'être dissous. Généralement, la matière végétale est séchée et pulvérisée puis imbibée dans un dissolvant organique pour extraire les métabolites secondaires. Ainsi deux étapes du procédé sont observées.

#### **Étape initiale**

Le grossissement des particules (les fragments solides), dû à la pénétration du solvant dans la phase solide, est observé. Cette pénétration est causée par les forces osmotiques, les capillarités et par la solvation des ions dans les cellules. Dans cette étape, certains composés endommagés dans les étapes ultérieures (fragmentation en particules, grincement, congélation, ...) sont extraits directement par lavage et les fractions solubles sont extraites. Dans quelques extractions, il peut y avoir la solubilisation des fractions naturellement insolubles par hydrolyse.

#### **Étape de diffusion**

La diffusion se produit en deux étapes, une à l'intérieur de la phase solide et la deuxième dans les couches externes qui entourent les particules solides.

Pour l'extraction des flavonoïdes colorés tels que les anthocyanes, l'étape de diffusion est immédiatement observée par coloration de la solution [7,61,62].

#### **b. Extraction par micro-onde**

Les micro-ondes sont des rayonnements avec une fréquences de 0.3 a 300 GHz. En raison de leur nature électromagnétique, le champ électrique provoque l'échauffement

par l'intermédiaire de deux mécanismes simultanées : la rotation dipolaire et la conduction ionique.

Dans ce cas, l'avantage du chauffage par micro – onde est la rupture des liaisons hydrogènes faible favorisée par la rotation dipolaire des molécules en affectant la rotation moléculaire. En outre, la migration des ions dissous augmente la pénétration de solvant dans la matrice. L'effet de l'énergie de micro-onde dépend de la nature de solvant et la matrice; ainsi des solvants utilisés généralement couvrent l'éventail de polarité de l'heptane à l'eau [63, 64].

### II.3.2. Extraction des flavonoides

Il n'y a pas une règle générale d'extraction des produits naturels. La littérature montre une diversité de techniques pour une même classe de substances naturelles.

Nous présentons dans ce qui suit un bref survol de quelques techniques d'extraction des flavonoides et saponosides que nous avons choisi de travaux récents.

E.Sreedevi et J.T.Rao (2000) ont isolé un flavanone glycoside à partir des graines de *Gliricidia maculata*, par extraction du matériel végétal avec EtOH 95% pendant 20h. L'extrait concentré est "tiré" respectivement par le chloroforme et l'acétone. Le résidu est dissous dans le MeOH et dilué avec Et<sub>2</sub>O donnant un précipité (flavanone glycoside) [65]. Moreira et coll (2000), ont pu extraire des flavonoides du *P. lhotzkyanum* successivement dans l'hexane et le méthanol à température ambiante. Les extraits de MeOH ont été évaporés à sec sous vide et dissous dans H<sub>2</sub>O/MeOH (7:3) et extraits successivement avec l'hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et n-BuOH. L'extrait de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a été fractionné sur colonne de gel de silice et élué avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH [66].

Parmi les protocoles adaptés pour l'extraction des flavonoides, il y a l'exemple de celui de F. Magalhaes et coll (2000) qui, à partir des racines sèches de *Lonchocarpus atifolius*, utilise successivement l'éther de pétrole (30-60C), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et MeOH pendant 60 h dans un appareil de Soxhlet. Après évaporation du solvant, l'extrait d'éther obtenu est une huile jaune visqueuse, l'extrait de dichlorométhane et celui de méthanol sont une gomme brune. Une partie de l'extrait d'éther a été soumise à la chromatographie sur gel de silice élué avec l'éther et dont la polarité d'éluant a été graduellement

augmentée par l'addition de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt et MeOH pour fournir 283 fractions réduites à leur tour en 43 fractions. L'analyse a permis d'isoler 12 flavonoides [66].

En 2000, N. Fonseca et coll ont isolé des flavonoides à partir de *Araucaria angustifolia* au moyen d'éthanol à température ambiante. L'extrait brut est suspendu dans un mélange méthanol/eau (4:1, 300 ml) divisé avec de l'hexane (3x300 ml) et du dichlorométhane (3x300 ml). La fraction de dichlorométhane a été soumise à la chromatographie sur colonne élué avec du ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH) aux polarités croissantes ensuite à la chromatographie sur couche mince pour donner deux composés et leurs isomères.

En 2001, Z. Akdemir et coll isolèrent deux flavonoides en extrayant le matériel végétal avec MeOH. Après l'évaporation sous vide, le résidu a été divisé entre  $\text{CHCl}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , la phase aqueuse lyophilisée et analysée par CC (polyamide) élué avec  $\text{H}_2\text{O}$  avec le mélange ( $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH) de polarité croissante [67].

En 2002, M. Soliman et coll isolèrent deux kaempferol acylylé glycoside à partir des fleurs de *Foeniculum vulgare* et *F. Dulce* avec EtOH (95 %) donne un résidu sec. Une masse de 5g de résidu est suspendue dans l'eau (250ml) et divisé respectivement avec de l'éther de pétrole, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et du n-Butanol. Le fractionnement d'extrait acétate d'éthyle a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur colonne en utilisons comme éluant le chloroforme et l'acétate d'éthyle de polarité croissante (5% →100%). Les deux composés ont été purifié avec chromatographie sur colonne (CC) après fractionnement [68].

P. Sauleau et coll (2003) ont isolé trois flavonoides à partir de la partie arienne de *Tanacetum parthenium* macérée avec de l'acétate éthylique à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration et évaporation du solvant, l'extrait a subit une deuxième macération avec le même solvant. Les extraits ont été dissous dans le MeOH. L'extrait methanolique a été évaporé sous vide et le résidu a été partagé entre l'eau et chloroforme. La partie chloroformique est fractionnée élué avec le chloroforme [69].

En 2003, M. L. Crublet et coll isolèrent trois Glycosides acylés de flavonol à partir de la feuille de *Planchonia grandis*. Les feuilles ont été macérés à température ambiante dans de l'éther de pétrole pendant 24 heures. Ces dernières, délipidées, sont bouillies

dans un mélange H<sub>2</sub>O / MeOH (1:4,6L) pendant 15 heures. Après refroidissement et filtration, l'extrait d'aq-méthanolique est évaporé pour fournir un résidu qui est dissous à son tour dans du MeOH. La solution méthanolique est ajoutée à Me<sub>2</sub>CO pour donner un précipité et, une partie de l'extrait obtenu est purifié par VLC. L'extrait est soumis à la CC utilisant un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (de 100:0 à 100) qui fournit un mélange des flavonoïdes qui sont purifiés par HPLC [70].

A. Yenesew et coll (2004), ont isolé des flavonoïdes à partir des tiges d'*E.abbyssinica* par percolation froide avec l'acétate d'éthyle, après évaporation du solvant sous pression réduite. Une portion de l'extrait a été fractionnée par CC élué avec n-hexane par une augmentation de polarité (10%,20%,30%,40%,50%,60%,80%et100%) de dichlorométhane. Une des fractions subit une chromatographie sur gel de silice. Ce dernier, imbibé par l'acide oxalique élué avec 2% d'acétate d'éthyle dans l'hexane et purifié avec PTLC (5% d'acétone dans l'hexane), a donné des composés purs (flavonoïdes) [71].

Une technique, réalisée par A. Ponce et coll (2004) pour l'isolement de quatre flavonoïdes, utilise un matériel végétal écrasé qui est ensuite extrait avec EtOH 98% à température ambiante pendant 4 jours (1.5 de EtOH pour un gramme de matériel végétal séché).

L'extrait d'éthanol obtenu individuellement de tige et des racines de *B. alba* ont été filtré et évaporé, le résidu dissout dans l'eau (150ml). Les solutions aqueuses ont été alors extraites successivement avec l'hexane, AcOEt et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50ml). Les fractions organiques obtenues ont été combinées dans l'hexane.

Les fractions d'AcOEt et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont évaporées à sec et analysées par CCM éluée avec AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-HCO<sub>2</sub>H (8 :12 :1). Les composés d'extrait d'AcOEt ont été séparés par la chromatographie préparatif CCM. Après l'évaporation des fractions organiques combinée, les quatre composés principaux ont été obtenus [72].

En 2004, M. Bassomo et coll, ont isolé et caractérisé neuf flavonoïdes à partir des feuilles de *Ochna afzelii* découpées, séchées à l'air libre puis finement broyées. La poudre obtenue a été extraite au MeOH à froid pendant 48 heures. La pâte verte foncée a été lavée à l'éther éthylique et la partie insoluble a été fractionnée par CC sur gel de silice avec un gradient CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH de polarité croissante [73].

Récemment M. Chacha et coll (2005) ont réalisé une extraction à partir des tiges sèches broyées en poudre de *Erythrina latissima* utilisant un mélange  $\text{CHCl}_3$ / MeOH (1:1). Après évaporation du solvant, le résidu de couleur marron a été dissous dans l'eau et divisé successivement entre  $\text{CHCl}_3$  et n-BuOH. L'extrait de  $\text{CHCl}_3$  subit une chromatographie par colonne normale en éluant  $\text{CHCl}_3$  / EtOAc (6:1). Quatre composés flavonoides ont été isolés après une analyse par CCM des résultats de fractionnement [74].

M. Machado et coll (2005) isolèrent quatre flavonoides : chalcone-flavone et biflavone à partir des feuilles de *Aristolochia ridicula* par extraction exhaustive à température ambiante successivement avec de l'hexane,  $\text{Me}_2\text{CO}$  et EtOH et, les extraits étaient alors individuellement concentrés. L'extrait acétonique brut a été partiellement dissous dans MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (4:1) pour donner une solution et un précipité. La fraction soluble a été ajustée sur MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (3:2) et lavée avec  $\text{CHCl}_3$  concentré puis fractionnée sur de Sephadex Lh-20 (MeOH) pour donner quatre produits [75].

En 2005, T. Ngadjui et coll séparent des chalcones et flavones à partir des tiges de *Dorstenia angusticornis* et *Dorstenia barteri*. Un kilogramme de chaque plante a été successivement macéré dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH (1:1) et MeOH respectivement pendant 24 heures et 4 heures à température ambiante. Les extraits ont été combinés et évaporés à sec jusqu'à l'obtention d'un résidu vert foncé. Une partie du résidu est soumise au VLC et éluee avec de l'éther de pétrole /40-60/ acétate d'éthyle (mélange), EtOAc et MeOH pour donner 54 fractions. L'analyse par CCM a permis d'identifier 5 produits purs [76].

#### II-4. Méthodes d'identification des flavonoides

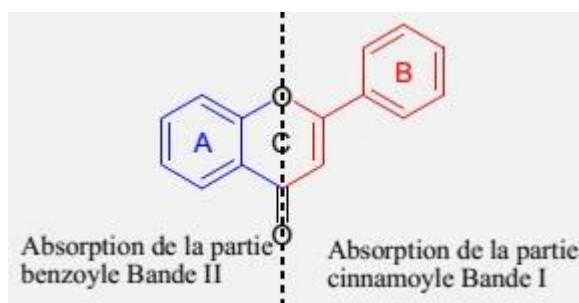
L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques : la spectroscopie de masse, la spectrométrie infrarouge, la spectrophotométrie UV-visible et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structural. Pour rappel, nous décrivons brièvement les techniques les plus utilisés par les phytochimistes [7].

### II-4.1. La spectroscopie U.V-Visible

Les techniques de spectroscopie U.V- visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée, ce qui permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption U.V-visible permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange par comparaison avec des témoins [77 -79].

Les spectres U.V-Visible des flavonoïdes sont caractérisés par la présence de deux pics d'absorption maximale. La première dans la gamme 240-285 nm (bande II, principalement due à l'absorption du cycle A) et la deuxième dans la gamme 300-550 nm (bande I, due à l'absorption du cycle B). La position précise et les intensités relatives de ces absorptions maximales fournissent des informations intéressantes concernant la nature du flavonoïde et des positions hydroxylées dans la structure [80].



**Figure 13:** Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

La substitution des flavonoïdes a un effet sur le déplacement de deux bandes (I, II) (le déplacement de la longueur d'onde  $\lambda$ ). Pour identifier la substitution structurale de composé flavonoïde par spectrophotométrie UV, on utilise les réactifs de déplacement (d'après Mabry et al, 1970) comme le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), le chlorure d'aluminium acidifié ( $AlCl_3/HCl$ ), le méthoxyle de sodium ( $MeONa$ ) et l'acétate de sodium ( $AcONa$ ) [81, 82].



## - Spectres U.V- Visible avec addition de réactifs

### a- Spectre UV- Visible en présence de $\text{AlCl}_3$ et $\text{AlCl}_3/\text{H}^+$

L'acide de Lewis forme avec les flavonoïdes contenant un groupement hydroxyle en C5 ou en C3 des complexes stables et des complexes instables avec des flavonoïdes possédant des groupements hydroxyles en position ortho. L'addition de l'acide chlorhydrique décompose le complexe formé avec les groupements hydroxyles en ortho et n'a aucun effet sur les complexes formés avec les groupements OH en C3 ou en C5.

### b- Spectre UV- Visible en présence de MeONa

MeONa est une base forte qui ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence d'un groupe hydroxyle en position 5.

### c- Spectre UV- Visible en présence de NaOAc

L'acétate de sodium NaOAc, base faible, ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH. Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7[80-82].

## II-4.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques, principalement la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$ , le phosphore  $^{31}\text{P}$ , et l'azote  $^{15}\text{N}$ .

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «spin».

La technique de la RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on

puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate [77 -79].

Différentes techniques peuvent être utilisées :

#### **II-4.2-a. RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)**

##### **RMN proton (<sup>1</sup>H)**

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton [77 -79].

##### **RMN carbone (<sup>13</sup>C):**

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Le DEPT permet la mise en évidence des carbones primaires (CH<sub>3</sub>), secondaires (CH<sub>2</sub>), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires.

On note que la différence majeure entre le DEPT 135° et le Jmod réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT [77 -79].

#### **II-4.2-b. RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)**

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps à savoir le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [77 -79].

#### II-4.2.c. Corrélations homonucléaires

- **COSY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ): fournit des informations sur les couplages homonucléaires  $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$  (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) : permet d'observer dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule [77 -79].

#### II-4.2.d. Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ( $^1\text{JH-C}$ ) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.
- **HMBC** ( $^2\text{JH-C}$ ,  $^3\text{JH-C}$ ) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance  $^2\text{JH-C}$ ,  $^3\text{JH-C}$  et permet également de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons [77 -79].

#### II-4.3. La spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduites dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse.

- l'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation (ESI)
- l'ionisation par impact électronique (IE)

- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- le Fast Atom Bombardment (FAB)

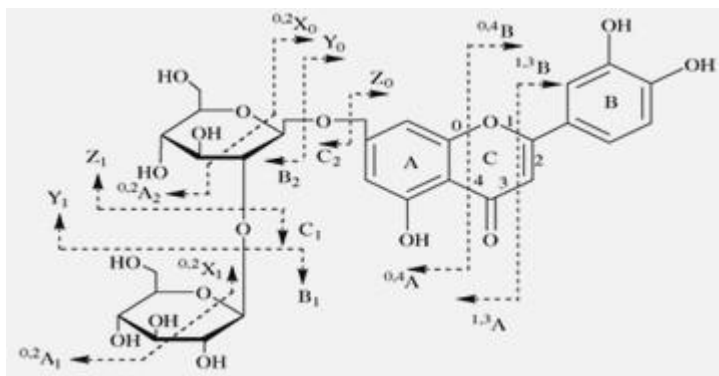
Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable.

On observe généralement l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton  $[M+H]^+$ . D'autres ions adduits peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion  $[M+Na]^+$ ), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion  $[M+K]^+$ ). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié [77 -79].

Enfin, nous notons qu'actuellement avec le développement des technique spectroscopiques et informatiques, on arrive à séparer et identifier des composés naturels à l'aide des méthodes de couplage : analytique – spectroscopique (GC/SM, HPLC/RMN, HPLC/IR, HPLC/SM, LC/RMN, LC/UV, LC/SM....).

#### a- Nomenclature.

Pour décrire les fragments de flavonoïdes obtenus par spectrométrie de masse, on utilisera le système de nomenclature proposé par Ma et al qui est désormais communément utilisé [83]. Pour les génines, les notations  $^{ij}A^\pm$  et  $^{ij}B^\pm$  sont utilisées pour désigner les ions primaires produits contenant les cycles, respectivement A et B, intacts (i et j désignant les liaisons qui ont été scindées). Dans le cas des flavonoïdes O-glycosylés, on utilisera la nomenclature de Domon et Costello reprise par Cuyckens et Claeys:  $Y_0$  désigne l'ion de la génine et  $Y_n$ , l'ion de la génine portant n monoglycosides.

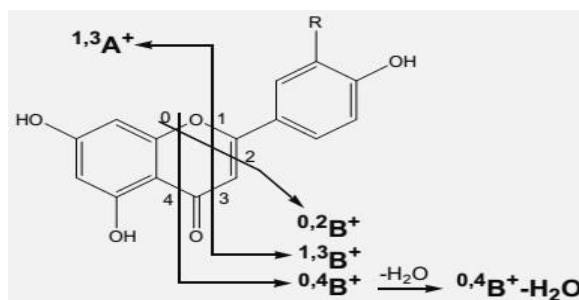


**Figure14:** Nomenclature utilisée pour désigner les fragments flavonoïdes

**b- Fragmentation de la génine en mode positif.**

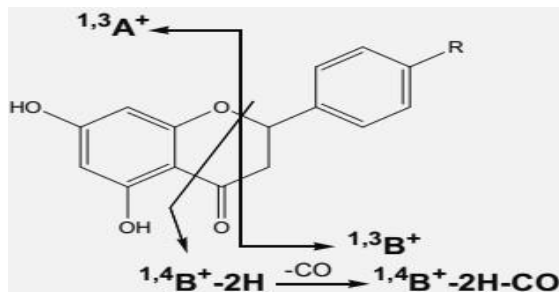
En mode positif, les fragmentations les plus utiles en terme d'identification de la génine sont celles qui ont lieu entre les liaisons C-C 1 et 3, 0 et 2 ou 0 et 4 sur le cycle C (figures 15), aboutissant à la formation des ions informateurs/diagnostiques  $^{ij}A^+$  et  $^{ij}B^+$  [84-86]. La fragmentation dépend de la classe de flavonoïdes étudiée et la valeur m/z des ions  $^{ij}A^+$  et  $^{ij}B^+$  indique clairement les substitutions respectives des cycles A et B.

**1-Flavones**



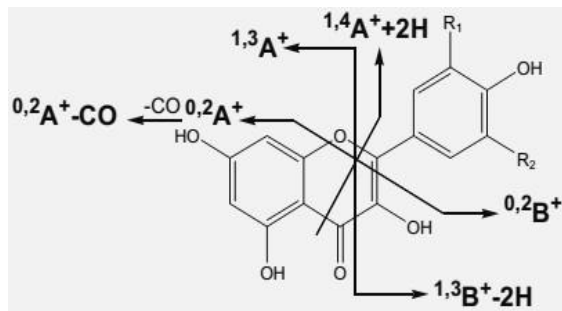
**Figure15:** Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones

**2- Flavanones**



**Figure16:** Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavanones

**3- Flavonols**



**Figure17:** Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavonols

### c- Fragmentation de la génine en mode négatif

Le mode négatif est très utilisé dans l'analyse par MS des flavonoïdes car il est plus sensible que le mode positif et produit un schéma de fragmentation légèrement différent apportant des informations nouvelles et complémentaires [87]

#### Fragmentation de la quercétine (flavonol)

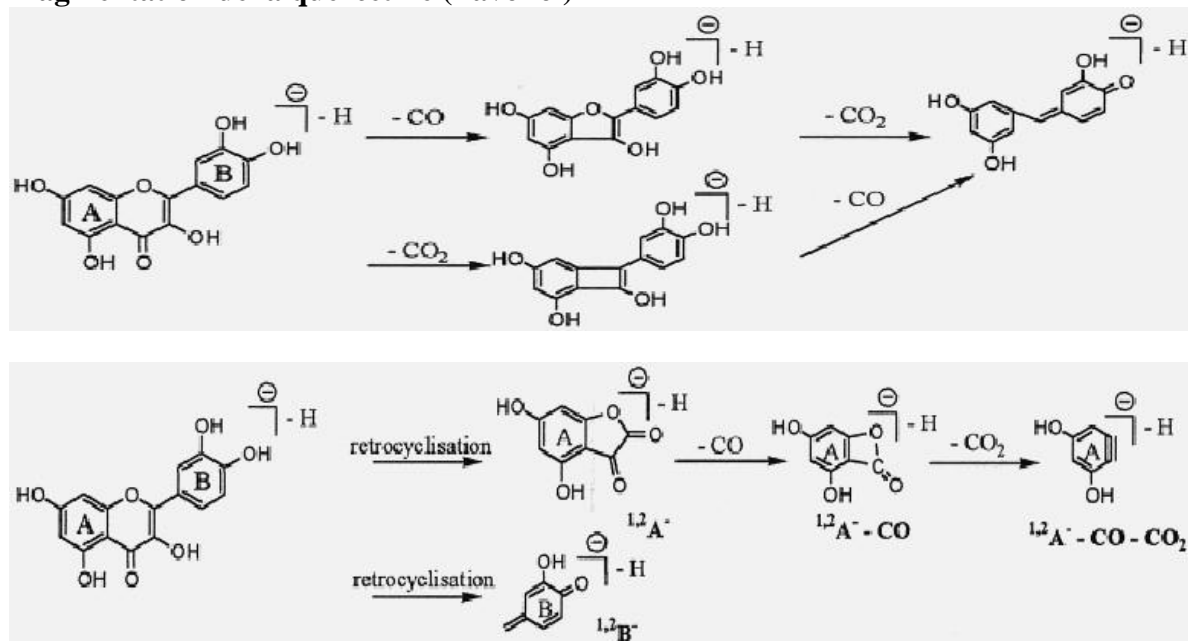


Figure18: Fragmentation de la quercétine

### d- Flavonoïdes méthoxylés

Dans les deux modes (positif et négatif), en plus de l'apparition d'ions dus à la fragmentation caractéristique des classes de génines, la perte de petites molécules neutres comme CO (-28 u), CO<sub>2</sub> (-44 u) ou C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (-42 u) et la perte successive de ces fragments, par exemple -H<sub>2</sub>O-CO (-46 u) est communément observée.

Les flavonoïdes monométhoxylés et les fragments [M+H-28]<sup>±</sup> et [M+H-29]<sup>±</sup> sont également caractéristiques alors que [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>±</sup>, [M+H-30]<sup>±</sup> et [M+H-28-30]<sup>±</sup> sont prédominants dans le cas de flavonoïdes polyméthoxylés.

### e- Flavonoïdes O-glycosylés

La fragmentation par spectrométrie de masse des flavonoïdes O-glycosylés produit un clivage de la liaison osidique avec réarrangement de protons. Il y a alors production de l'ion fragment Y<sub>0</sub><sup>+</sup> ou Y<sub>0</sub><sup>-</sup> (fragment correspondant à la génine) et élimination d'un résidu monosaccharidique qui s'illustre par la perte de 162 u

pour un hexose, 146 u pour un rhamnose, 132 u pour un pentose et 176 u pour un acide glucuronique permettant ainsi de déterminer la nature des sucres.

### 1- Clivage hétérolytique : formation des ions $Y_n$

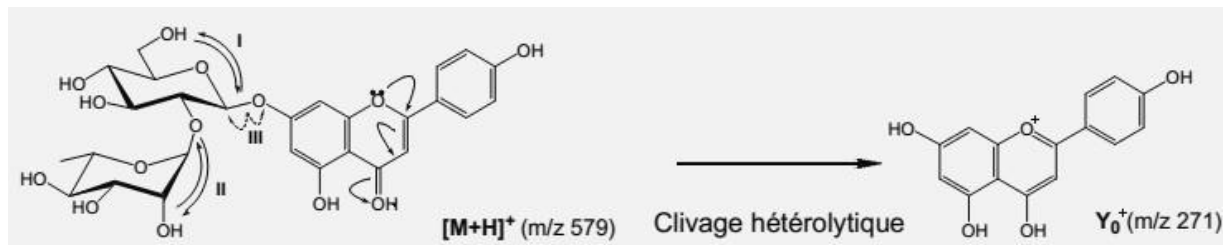


Figure19: Clivage hétérolytique

### 2- Clivage homolytique : formation du radical $Y_0^\bullet$

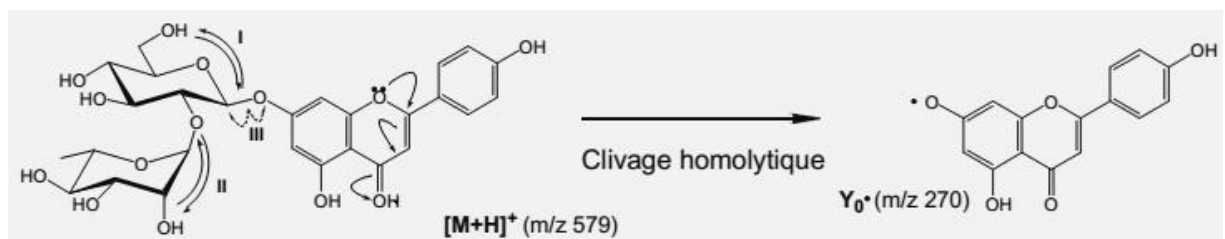


Figure20: Clivage homolytique

La fragmentation d'un flavonoïde glycosylé  $[M-H]^-$  génère un radical anion alors que l'activité antioxydante génère un produit radicalaire neutre [85, 87].

## II-5. Conclusion

La médecine traditionnelle est pratiquée depuis l'origine de l'humanité. Par tâtonnements successifs, les êtres humains ont peu à peu trouvé des moyens de soulager la douleur, de soigner la maladie et de vivre en harmonie avec la nature.

Les plantes médicinales représentent justement un composant important dans les médicaments traditionnels. Dans le présent, comme dans le passé, les plantes médicinales jouent un rôle très important dans le système d'hygiène primaire.

L'isolement des composés naturels et leurs purifications sont basés sur l'utilisation de combinaisons de méthodes chromatographiques. La détermination structurale est obtenue grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques telles que l'ultraviolet, l'I.R., la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

Des différents travaux de part le monde ont été réalisés pour isoler et identifier des composés naturels, plus particulièrement les flavonoides.

Comme nous l'avons indiqué dans la synthèse bibliographie, il n'y a pas une règle générale pour l'extraction et la purification de ces composés. Pour y arriver nous avons ulstré notre analyse par des exemples divers.

La spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à l'identification structurale des flavonoïdes.



# *Partie Expérimentale*

## *Chapitre III Matériels Et Méthodes*

## Etude botanique

### 1. Introduction

Le choix des plantes pour la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles n'est pas basé sur le seul hasard, mais selon un choix bien ciblé. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier [1].

La valorisation des plantes médicinales est basée plus particulièrement sur leurs études biologiques (activité antimicrobienne, cytotoxique, anti-inflammatoire, antidiabétique, antihépatite....), et leur exploration phytochimique, pour l'obtention de nouveaux produits à applications diverses.

Il est à noter que l'un des buts essentiels de l'examen phytochimique est la détection des classes de composés existants dans les différents organes de la plante (feuille, racine, tige, rameaux). Ceci constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques [9].

### 2. Classification botanique de la plante

*Limoniastrum feei* est un arbuste bas de 10-40 cm à feuille plus longue et plate serré en rosette au sommet des rameaux floraison sous forme de lampe florifère sans feuille. Fleurs entourées de bractées épineuses d'un rouge violace. On la rencontre un peu partout surtout aux niveaux des zones rocailleuses, hamadas [88-90].

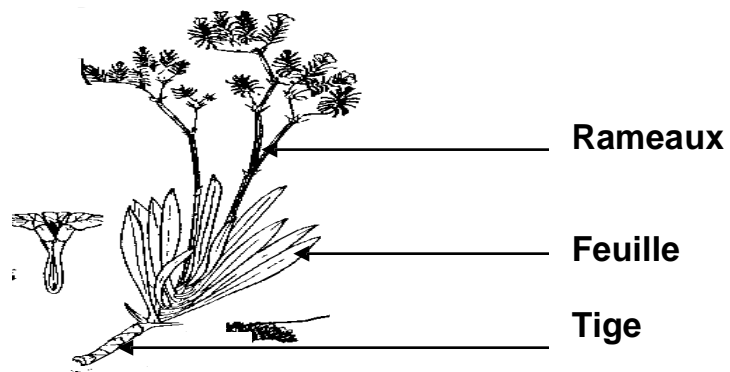


Fig -21 : Morphologie générale de *limoniastrum feei*[88]



**Fig – 22:** Zone de distribution (région Béchar)

**III-2.1. Famille :** Plumbaginaceae

Famille appartenant au phylum qui regroupe urticale, amentiflores et setospermales et à l'ordre des plumbaginales.

Les plantes de cette famille habitent surtout les terrains salés. Elles contiennent dans leurs tissus, surtout au niveau des feuilles, des glandes sécrétrices de calcaire, ce qui leur confère au toucher un aspect rugueux. Les fleurs sont groupées en épillets, eux-mêmes réuris en particules. Chaque épillet est formé de une à trois fleurs entourées de trois bractées dont la morphologie est un critère de détermination des espèces. Le calice est souvent coloré et la corolle y est souvent incluse [88-90].

**III-2.2. Genre :** *Limoniastrum*

Plantes vivaces ou arbustes à feuilles oblongues, charnues, coriaces. Inflorescences constituées d'épillets, 1- pluriflores entourés de 2-3 bractées scarieuses, en épi lâche, à axe comprimé et articulé [88, 89].

**Tableau 2** - Richesse d'espèce endémique du genre *Limoniastrum* dans la flore du Maghreb [91].

Genre	Nombre d'espèce endémique dans le genre	nombre total d'espèce dans le genre	de % d'endémiques dans le genre
<i>Limoniastrum</i>	4	5	80

### III-2.3. Espèce : *Limoniastrum feei*

Petit arbuste à tige ligneuse et épaisse à la base, dressés et rameuse dès sa moitié. Cette tige porte les feuilles disposées en rosette à sa base. Ces feuilles sont longues, légèrement sinuées sur les bords, plates et charnues à limbe farineux par la présence de concrétions calcaires, ce qui leur confère au toucher un aspect rugueux. Les fleurs sont groupées à l'extrémité de longs et fins rameaux dépourvus des feuilles. Le calice est coriace, de couleur rouge violacée. Il porte de nombreuses pointes garnies de poils blancs. La corolle présente des pétales soudés en tube de couleur rouge violacée. L'androcée est formé de cinq étamines et l'ovaire est surmonté de cinq styles soudés dans leur partie inférieure. Les feuilles sont utilisées pour soigner les maux de ventre et les diarrhées [88-90].

### III-2.4. Nom vernaculaire : Melefet El khadem



**Fig - 23 :** *Limoniastrum feei*(région Béchar)

### III-3. Etude Ethnopharmacologique

Nous avons réalisé une enquête dans la wilaya de Béchar (figure 24) et ces communes (Lahmer, Boukais, Kenadsa) durant trois à quatre mois à travers d'une fiche d'enquête (la partie utilisé, maladies traités, préparation) touchant ainsi 150 personnes (herboristes, des patients et des vieillards).

L'objet de cette étude est de connaître l'utilisation de *Limoniastrum feei* dans la médecine traditionnelle

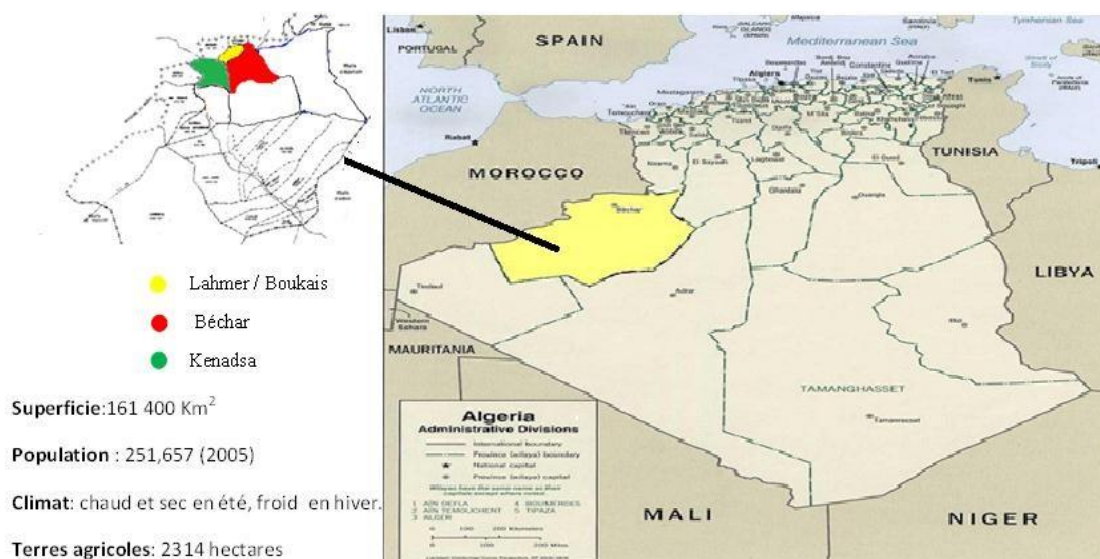


Fig-24 : Carte présentant la zone d'étude

### III-5. Criblage phytochimique

#### III-5.1. Matériel végétal

*Limoniastrum feei* a été récolté durant les mois mars et avril (20/03/2012 et 16/04/2012) dans la région du Lahmer, Boukais et Kenadsa (wilaya de Bechar).

Haut du formulaire

Au cours de cette étude, quatre solvants d'extraction de polarités différentes (eau, éthanol, chloroforme et l'acide chlorhydrique) sont employés. La méthode d'extraction consiste à porter l'échantillon de la plante au reflux de l'un des solvants cités ci-dessus pendant un temps déterminés. Cette technique permet d'extraire toutes les familles de composés chimiques présents dans la plante étudiée.

#### III-5.2. Produit végétal épuisé avec le HCL dilué

On met 5g de matière végétale dans un bêcher, avec 50ml de HCl dilué et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 min, puis on filtre le mélange, pour les tests suivants :

#### Alcaloïdes

A l'extrait acide ajouter l'ammoniac  $\text{NH}_4\text{OH}$  pour alcalise le milieu et à l'aide d'une ampoule à décanter extraire la solution avec 30ml de chloroforme  $\text{CHCl}_3$ , évaporer la phase organique puis ajouter 2 ou 3 goûtes du réactif de mayer.

L'apparition d'un précipite blanc indique la présence des alcaloïdes.

### **III-5.3. Produit végétal épuisé avec l'eau distillé**

Dans un bêcher on met 3g de matière végétale en présence de 20ml d'eau distillé, porter l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 10 min à une température inférieur à la température d'ébullition, filtrer le mélange, puis soumettre l'extrait aux tests suivants:

#### **Saponosides**

Refroidir la solution et ajouter 8 ml de la solution dans un tube à essai, puis on agite fortement pendant 60 secondes et on laisse reposer 30 secondes et on mesure la hauteur de la mousse.

#### **Cardinolids**

3g d'extrait de matière végétale macérée dans 20ml d'eau distillée pendant 24 heures. Filtrer la solution, puis on fait une extraction de 10ml du filtrat avec 10ml du mélange chloroforme/éthanol évaporer la phase organique et dissoudre le résidu dans 3ml d'acide acétique glacial, ajouter quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  et 1ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition de la couleur bleue verte dans la phase acétique indique l'existence des cardinolides.

### **III-5.4. Produit végétal épuisé avec l'éthanol 50 %**

Mettre 3g de matière végétale en présence de 20ml d'éthanol dans un bêcher porter l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 min, filtrer le mélange puis soumettre l'extrait éthanolique aux tests suivants :

#### **Tanins**

Traiter 5ml de la solution avec quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$ . L'apparition d'une coloration verte indique l'existence des tanins.

### **III-5.5. Produit végétal épuisé avec le chloroforme**

Dans un bêcher en met 3g de matière végétale en présence de 20ml de chloroforme  $\text{CHCl}_3$ . Porter l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 min, filtrer le mélange ensuite soumettre l'extrait aux tests suivants

#### **Stérols insaturés et terpènes**

Mettre le filtrat dans un tube a essai, ajouter 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  avec précaution sur les parois du tube l'apparition à L'intersection entre les deux phases d'une couleur verte qui se transforme en rouge signale l'existence des stérols insaturés et terpènes.

### **III-5.6. Produit végétal macéré avec l'éthanol 70%**

Dans un flacon, mettre 3g de matière végétale en présence de 20ml de l'éthanol pendant 48 heures, filtrer le mélange en suite soumettre le macéra aux tests suivants



### **Stéroïdes**

Evaporer la solution, dissoudre le résidu avec 15 ml de chloroforme  $\text{CHCl}_3$  et on filtre plusieurs fois (3 fois) on divise le filtrat en deux parties dans deux tubes à essai :

Première partie

Ajouter 1ml de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  puis 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré sur les parois du tube avec précaution. L'absence de la couleur verte indique la présence des stérols insaturés

### **Deuxième partie**

Ajouter à volume égal du  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré sur les parois du tube avec précaution l'apparition du couleur jaune qui se transforme en rouge indique l'existence du stéroïde.

### **III-5.7. Produit végétal macéré avec le HCl dilué**

Dans un flacon, mettre 5g de matière végétale en présence de 75ml de HCl dilué pendant 48 heures, filtrer le mélange en suite soumettre le macéra aux tests suivants :

#### **Flavonoïdes**

- 1) 10ml de filtrant alcaliser par  $\text{NH}_4\text{OH}$  l'apparition de la couleur jaune claire indique la présence des flavonoïdes.
- 2) A 10ml du filtrant ajouter 5ml de l'alcool amylique, la phase alcoolique se colore en jaune indique la présence des flavonoïdes libres.
- 3) Evaporer sous vide la phase aqueuse du 1<sup>er</sup> test dissoudre le résidu avec 3ml de HCl dilué et on chauffe légèrement puis on refroidi pour réaliser les tests :
  - a) Ajouter 2,5ml d'alcool amylique, l'apparition de la couleur jaune indique la présence des hétérosides flavonique
  - b) Ajouter une petite quantité de Mg à l'extrait acide l'absence de la couleur rouge indique l'absence des glucosides flavoniques.

### **IV-1- Activité antioxydante**

#### **IV-1- 1- Définition des antioxydants**

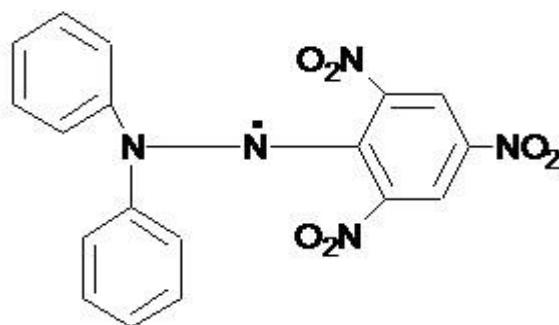
Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique) Une définition large du terme antioxydant donnée par B. Halliwell est « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat ».

En tant qu'additif alimentaire, un antioxydant est une molécule qui protège les aliments contre les réactions d'oxydations qui accélèrent leur vieillissement. Ceci est dû essentiellement à l'oxygène de l'air, la lumière, les traces de métaux et éventuellement certains enzymes [78].

#### IV-1- 2- Principe de la méthode

##### 1. Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant

Le composé chimique 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényle- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [79,80]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.1). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.



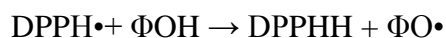
**Figure .25:** Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazyle).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

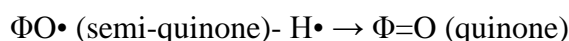
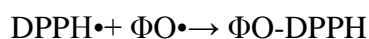
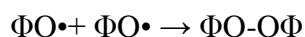
- la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;
- la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycolyses et des anthocyanes) [81,82].



Dans le cas des composés phénoliques ( $\Phi$ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transforme en une molécule stable DPPHH [83,84] :



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus ou moins stables :



La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier [83,85].

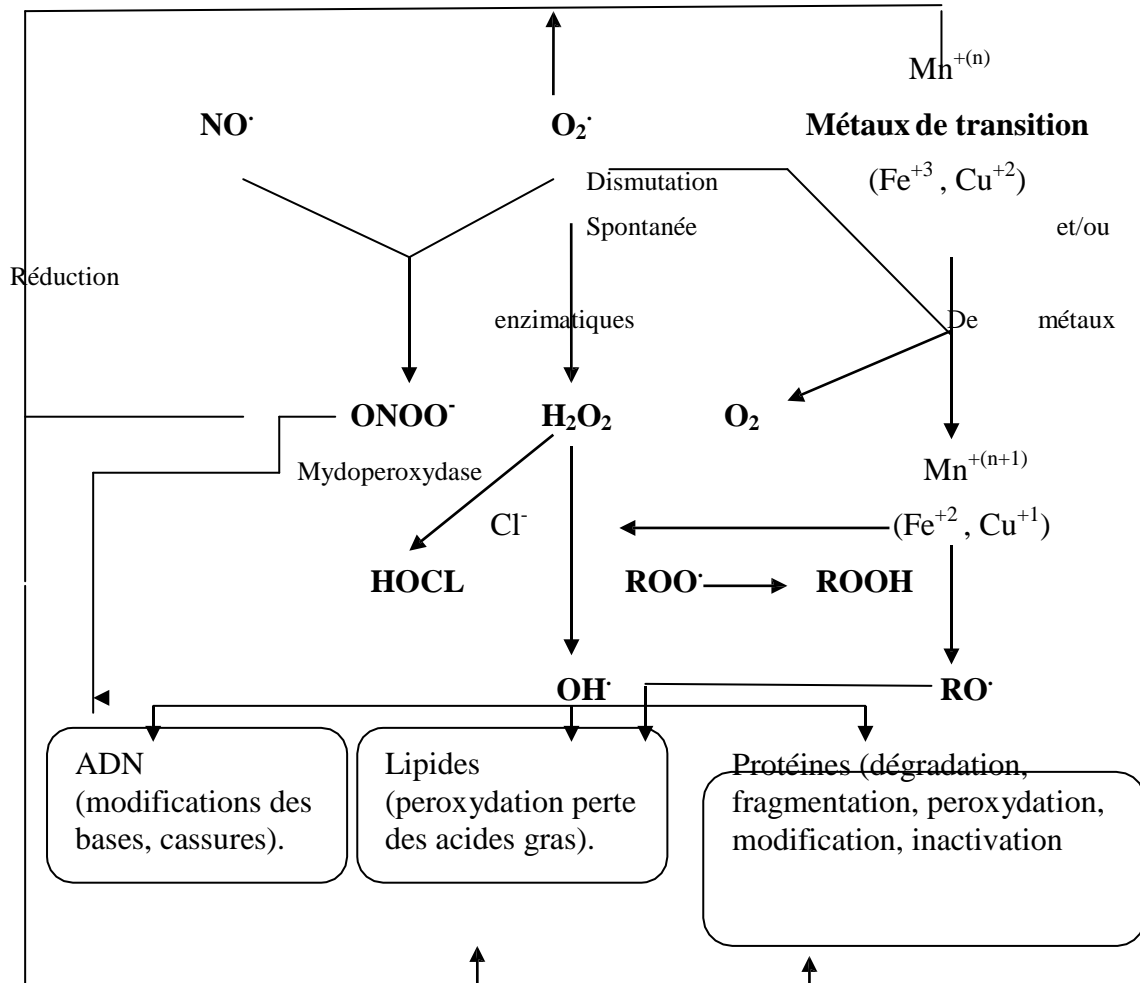
## 2. Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives :

Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire, et de diverses pathologies allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète [86].

## 3. Stress oxydatif et ses conséquences biologiques :

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique [87,88].



**Figure.26:** Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives [88].

## Test antioxydant

### a) Protocol

Après la préparation des extraits méthanolique, éther diéthylique, Acétate d'Ethyle, et butanolique, Ces dernier est soumis à une séparation chromatographique sur couche mince avec utilisation du Hexane / Acétate d'Ethyle comme éluant. Après dépôt de notre extrait sur la plaque, cette dernière est développée dans une chambre chromatographique, la hauteur de la migration est 70mm. Après 15min de séchage de la plaque à l'air libre, cette dernière est exposée à une pulvérisation par une solution méthanolique

de DPPH 0,004% (m/v).Après 30min de séchage de la plaque dans un étuve à 60°C, voir la coloration des sports.

**Remarque :** Prendre une autre plaque et refaire le même mode opératoire, mais cette fois-ci pulvériser la plaque avec de l'acide sulfurique 10% (v/v).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration :

- Jaune pour la plaque pulvérisé avec du DPPH.
- Pourpre pour la plaque pulvérisée avec acide sulfurique..

## **b) Pouvoir antioxydant par test au DPPH**

### **Matériels utilisés**

- Papier aluminium
- 20 flacons de pénicilline « propre »
- 3 flacons : le premier pour préparer la solution de DPPH
- Le deuxième pour préparer l'extrait à tester.
- Le troisième pour préparer la solution d'acide ascorbique
- Méthanol ; DPPH ; Acide ascorbique. Cuvettes en quartz ; Micropipettes ; vortex.

### **Préparation de l'extrait à tester**

Dissoudre 2mg du résidu de la plante dans 2 ml de méthanol (solution mère 1mg/ml). Préparer différentes concentration de l'extrait (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,312; 0,0156; 0,0078) mg/ml.

### **Préparation de solution de DPPH dans le méthanol**

Dissoudre 1mg de DPPH dans 25ml de méthanol qui serve comme solution stock. Protéger la solution de la lumière en recouvrant le tube avec papier aluminium. Le mélange est conserve dans le frigo a -4°C a l'obscurité. Il faut utiliser cette solution dans un intervalle de 1 à 4 jours.

### **Protocole du pouvoir antioxydant**

Ajouter 1,9 ml de la solution méthanoliques de DPPH (0,004%) a 100µl de l'échantillon dissout dans le méthanol à différentes concentration. Après 30 min de réaction, l'absorbance est mesurée à 710nm. Refaire l'essai trois fois.

**Remarque :**

Nous avons effectué l'essai de l'activité antioxydante pour le control positif (acide ascorbique) aux mêmes concentrations ci-dessus.

$$DPPH=100*(1-AE/AD)$$

La courbe d'étalonnage ( $Y=0,0132 X -0,0057$ ) ou :

Y : absorbance.

X : % de DPPH.

On calcul X et en trace la fraction AA% = f(t).

**c) Evaluation de l'activité antioxydant**

Deux méthodes ont utilisées pour cette évaluation.

**1- Test qualitatif HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).**

Ces tests nous semblent indispensables pour confirmer le pouvoir antioxydant de nos extraits avant d'entamer l'évaluation anti-radicalaire par quantification spectrophotométrique.

**2-Test antioxydant par quantification spectrophotométrique**

L'activité antioxydant exprime la capacité de réduction des radicaux libres par nos extraits. Avons utilisé la méthode au DPPH, ce radical libre présent une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydants, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle [4].

Dans cette technique, l'absorbance de chaque concentration des extraits a été mesurée. Ensuite le pourcentage d'inhibition %RSA (Radical Scavenger Activity) a été calculé pour chaque dilution en utilisant l'équation suivante :

$$\%RSA = (ABS_{\text{contrôle}} - Abs_t) / ABS_{\text{contrôle}} * 100$$

Avec :

**Abs<sub>contrôle</sub>** : Correspond l'absorbance de DPPH à  $\lambda=517$  nm

**Abs<sub>t</sub>** : Correspond l'absorbance de l'extrait à  $\lambda=517$  nm

Par la suite, on utilisant les valeurs des pourcentages d'inhibition, les courbes % RSA=f(C) ont été tracées respectivement pour les extraits brut méthanolique, et extrait Hexane, Acétate D'Ethyle, et butanol, avec la prise en considération de acides ascorbique comme étant de contrôle positif. Afin de pouvoir d'déterminer l'effet

antioxydant de nos extraits, la IC<sub>50</sub> de chacun a été calculée et comparée à celle de l'acides ascorbique.

#### **IV-2- Activité antibactérienne**

C'est une méthode de mesure in- vitro du pouvoir antibactérien des composées .la technique utilisée est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et la méthode de diffusion, nous avons adopté la dernière, qui est vieille méthode, mais toujours d'actualité puisqu'elle est encore utilisée fréquemment dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antibactérien des antibiotiques de synthèse [90].

##### **IV-2-1-Repiquage des espèces bactériennes**

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

##### **IV-2-2-Préparation de l'inoculum**

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

##### **IV-2-3-Préparation des disques**

Des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif [89].

##### **IV-2-4-Mueller-Hinton**

Ce milieu riche est la gélose de référence pour la réalisation d'antibiogramme selon la méthode de Kirby-Bauer. Sa composition (notamment la concentration en magnésium, en calcium, en thymine et en thymidine), son épaisseur sont standardisées (norme standards M6-P du NCCLS). Il permet la pousse de nombreux micro-organismes [75].

##### **-Préparation des milieux de culture**

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète (obtention d'une solution limpide). Puis, on ajuste le PH au 7,4.

#### **IV-2-5-Ensemencement**

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

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

L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C [89].

#### **IV-2-6-Lecture :**

Après la culture, la lecture s'effectue en mesurant sur chaque disque le diamètre d'inhibition du principe actif. Cette distance millimétrique est ensuite reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprète en sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de principe actif étudié [91].

#### **Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne :**

Le principe de cette méthode, consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose. Cette source peut être, soit du papier buvard imprégné d'une concentration fixe d'antibiotique, soit une cupule (puits cylindrique) remplie d'une dilution d'antimicrobien. Un gradient de concentration est obtenu par diffusion du produit antimicrobien à partir de la zone source. La mesure de la zone d'inhibition a lieu après 24h d'incubation à 37 °C.

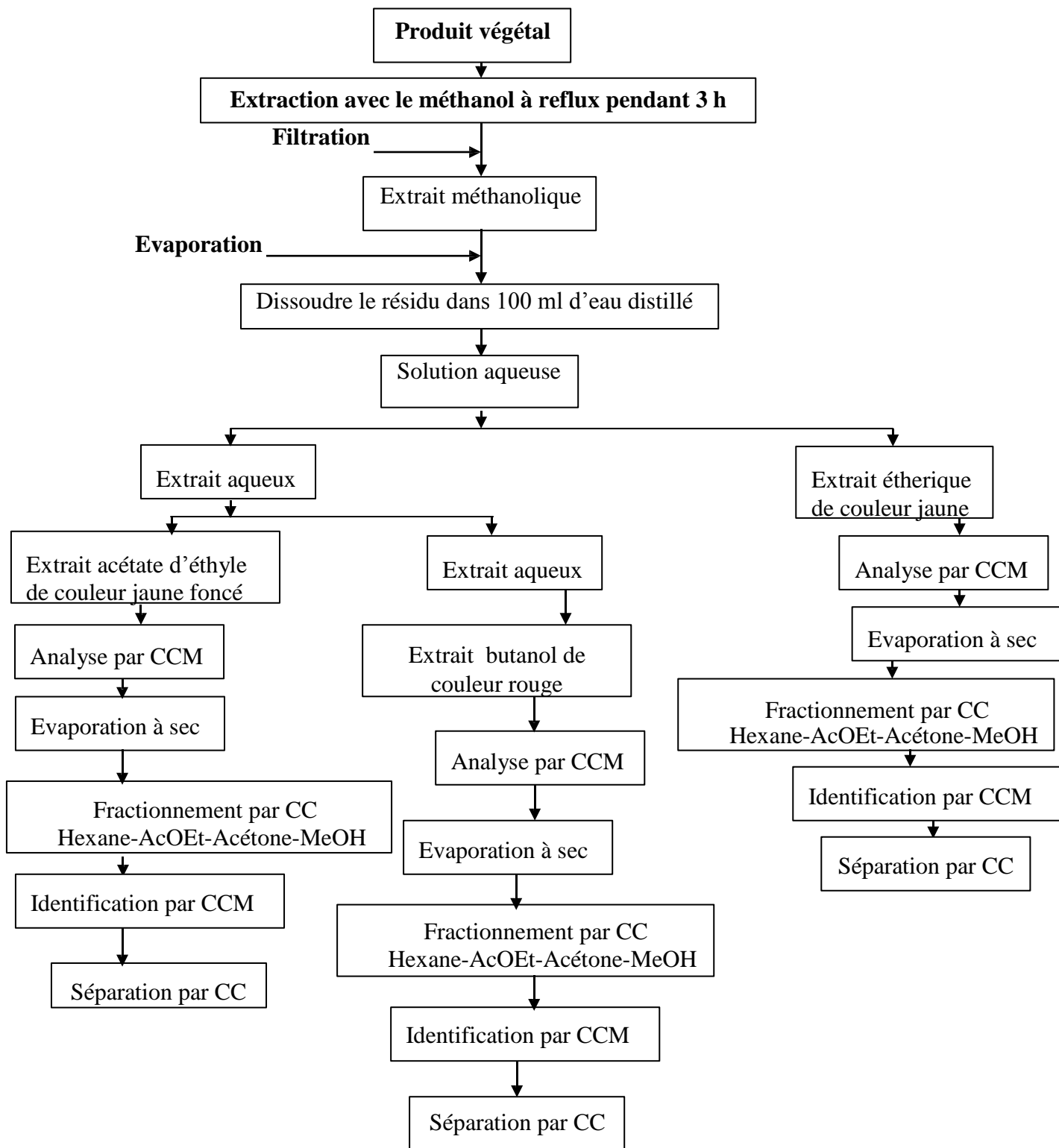
## **IV-2. Investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de *Limoniastrum feei***

### **IV-2.1. Protocole d'extraction**

L'extraction des substances naturelles a été effectuée séparément sur les trois parties de *Limoniastrum feei* (feuille, tige et rameaux), le même protocole d'extraction a été adapté selon l'organigramme.

Dans un ballon mono colle surmonté d'une réfrigérant en place 100g de poudre végétale en présence de 400 ml du méthanol (MeOH), on porte l'ensemble à reflux pendant 4 heures, après filtration l'extrait est évaporé à sec et on le dissout dans 100 ml d'eau distillée pour donner une solution aqueuse de couleur marron.

La solution aqueuse est partagée en trois parties, pour l'extraire séparément avec : éther éthylique, AcOEt et le butanol. A noter que chaque extraction est réalisée trois fois avec 40 ml de solvant d'extraction, afin de tirer le maximum de substance de la phase aqueuse.



**Fig-27 :** Organigramme du protocole d'extraction méthanolique et séparation



## Stratégie de séparation

- 5g de l'extrait méthanolique est repris pour l'analyse chromatographique, dissoudre cette masse avec une petite quantité du méthanol.
- L'extrait brut à été soumis a fractionnée par une chromatographie liquide sur colonne remplie par 30 g du gel de silice.
- L'élution a été effectuée au moyen des différents gradients de chloroforme et le méthanol.
- Les fractions obtenus sont analysées par chromatographie sur couche mince CCM par un système d'éluant : Hexane/ Acétate d'Ethyle (40/50).



*Partie Expérimentale*

*Chapitre IV Résultats  
Et Discussion*

## Introduction

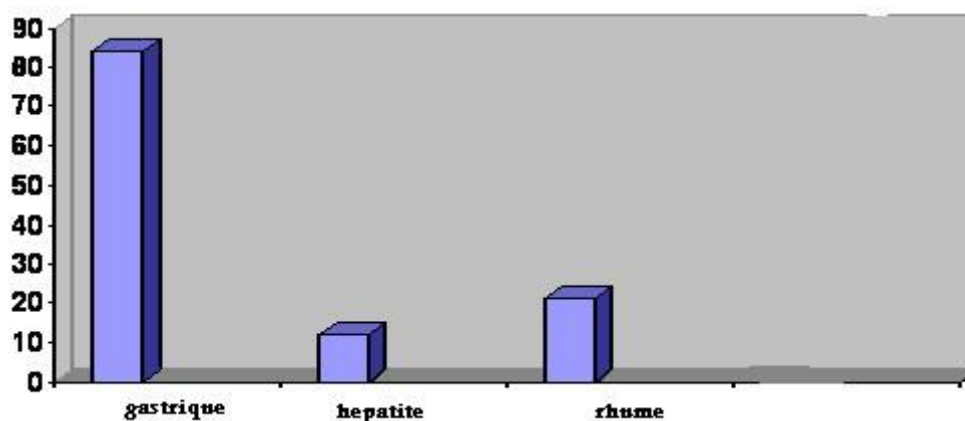
De nombreuses plantes, alimentaires ou médicinales, renferment des constituants antioxydants. L'apport régulier en phytonutriments possédant des capacités antioxydantes significatives est associé à une faible prévalence de maladies liées au stress oxydatif (cancers, maladies cardiovasculaires et athérosclérose) (Bravo, 1998) et à un faible taux de mortalité (Anderson et al, 2001).

Basé sur la technique bioguidé, notre choix est fixé sur l'extrait plus actif à savoir l'extrait méthanolique.

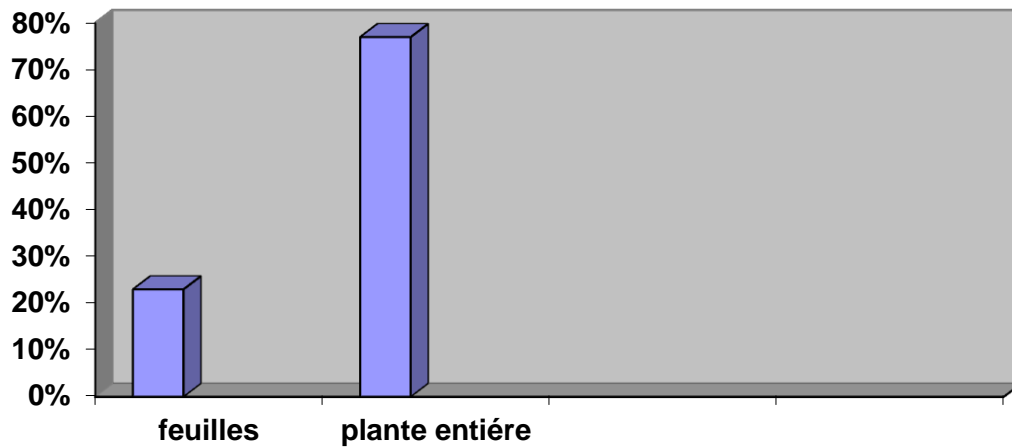
Notre étude approfondie a été effectuée sur l'extrait méthanolique, plus riche en flavonoïdes et saponosides tritépéniques comme nous l'avons montré dans criblage phytochimique.

## 1- Etude Ethnopharmacologique

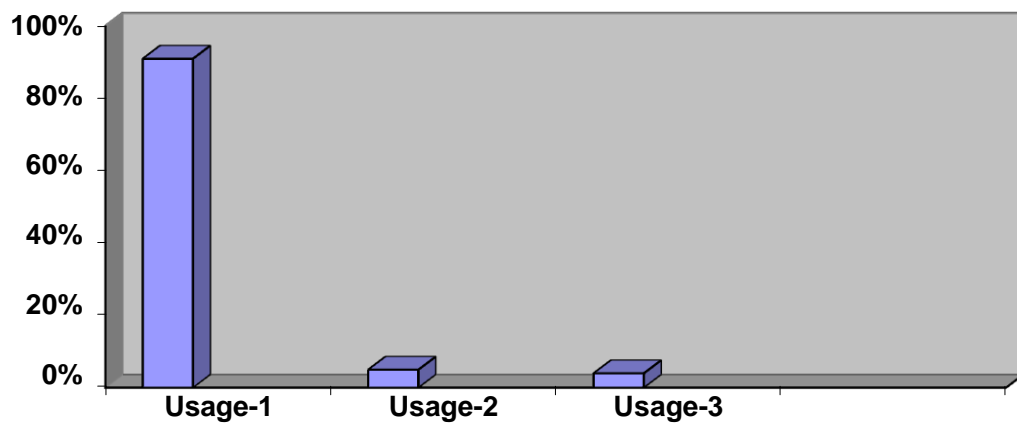
### 1.1- Résultats d'enquête ethnopharmacologique



Nous remarquons que l'usage le plus important par la population est le traitement des maladies gastriques



Nous pouvons tirer que l'efficacité de la plante réside dans l'utilisation de la plante entière.



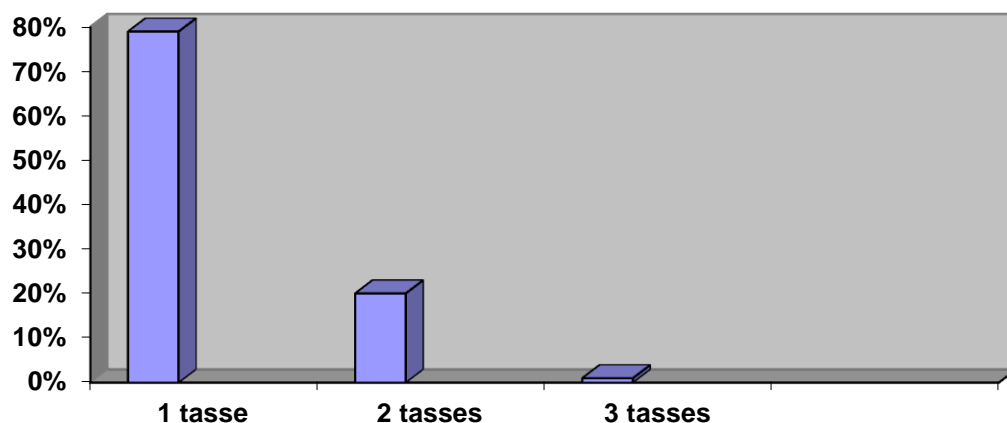
**Fig-28** : les différentes maladies traites par la plante, les parties les plus utilisées et les façons de préparation

**Usage-1:** la plante est utilisée en décoction, la solution est prise à froid après filtration

**Usage-2:** finement moulus, les feuilles de la plante sont prises avec de l'eau

**Usage-3:** le macéra des feuilles de la plante est pris après trois jours de macération.

Nous constatons que la forme décoction est la plus employé par la population.



**Fig-29 : Les quantités prise par jours**

Nous constatons que la posologie la plus adoptée est celle d'une seule tasse par jour.

Nous déduisons de cette enquête ethnopharmacologie effectuée dans la région de Bechar, que la plante en question traite la majorité des maladies gastriques et ceci en utilisant toutes les organes de la plante. En décoction avec une posologie d'une seule tasse par jour.

## **2- Résultats du Criblage phytochimique**

Les masses des extraits de la plante après évaporation changent d'un solvant à autres selon la polarité, ainsi les extraits aqueux et méthanolique ont une masse considérable par rapport à l'extrait heptane (Fig-30).

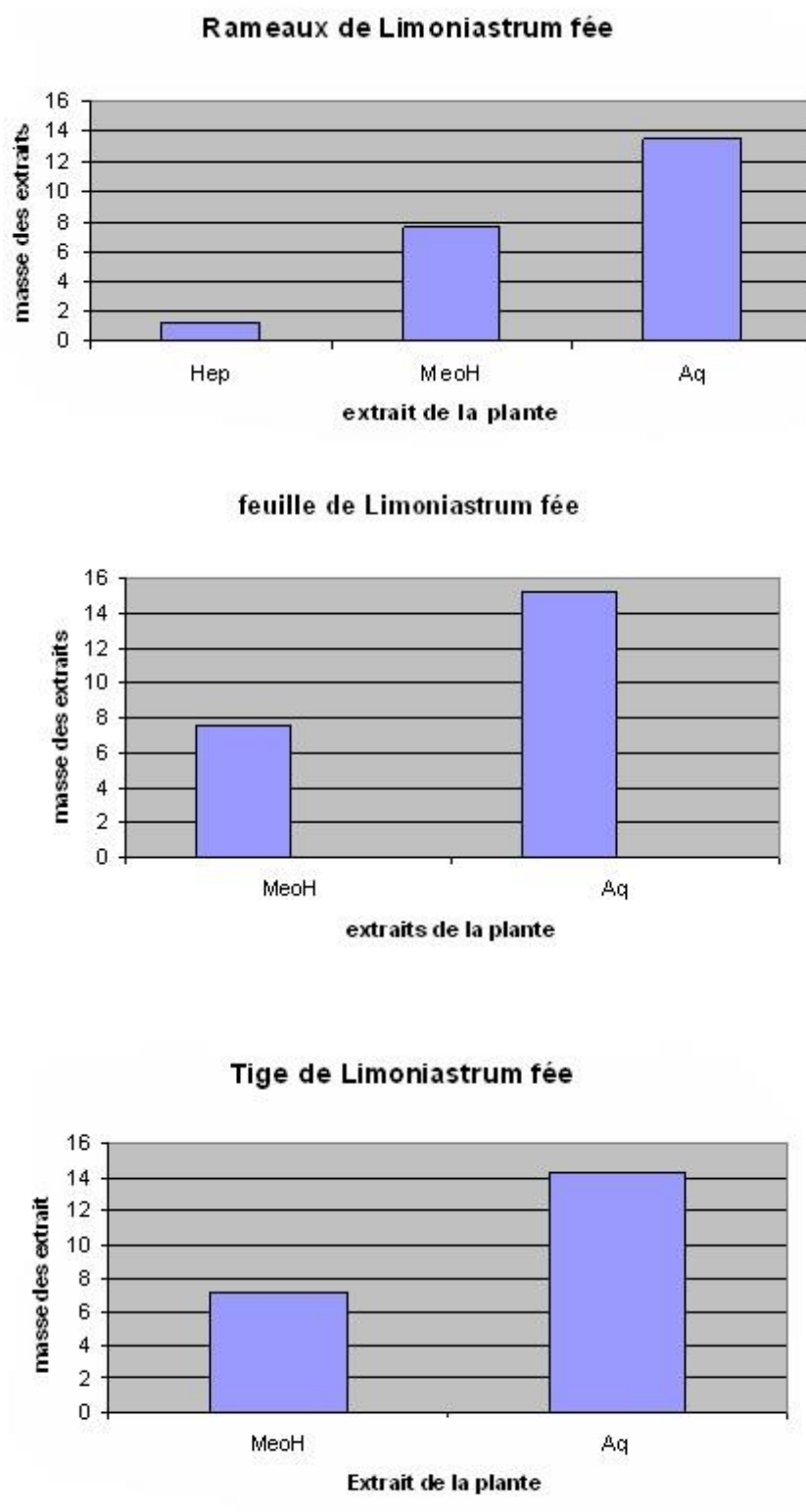


Fig-30 : Effet de solvant d'extraction

Les résultats de criblage par les deux procédés épuisement et macération sont consigné dans les tableaux 4 et 5.

**Tableau 4 : Résultats avec épuisement**

organe	Extrait	Alcaloïde	Saponoside	Tanin	Stérol insaturé et terpène
Feuille	MeOH	-	+	+	+
	Aqueux	-	+	+	-
Tige	MeOH	-	+	+	+
	Aqueux	-	+	+	+
Rameaux	MeOH	-	+	+	-
	Heptane	-	+	+	+
	Aqueux	-	+	+	+

(-) Absance      (+) Présence

**Alcaloïdes:** absence dans les trois parties (feuille, tige, rameau) de la plante

**Saponosides:** Existent en quantités considérables dans les trois parties (feuille, tige, rameau) de la plante

**Tanins:** Présent dans les trois parties (feuille, tige, rameau) de la plante

**Stéroles insaturés et terpènes:** Existent en quantités considérables, dans la plante.

**Tableau 5 : Résultats avec macération**

organe	Extrait	cardénolide	flavonoïde	stéroïde
Feuille	MeOH	-	+	+
	Aqueux	-	+	-
Tige	MeOH	+	+	-
	Aqueux	-	+	-
Rameaux	MeOH	+	+	-
	Heptane	+	+	+
	Aqueux	-	+	-

(-) Absance      (+) Présence

**Cardinolides:** Le test effectué, est positif, pour l'extrait méthanolique des Tige et pour les extraits méthanolique et d'heptane des Rameaux de la plante.

**Stéroïdes :** Sont présents, seulement dans l'extrait méthanolique des feuilles et d'heptane des rameaux.

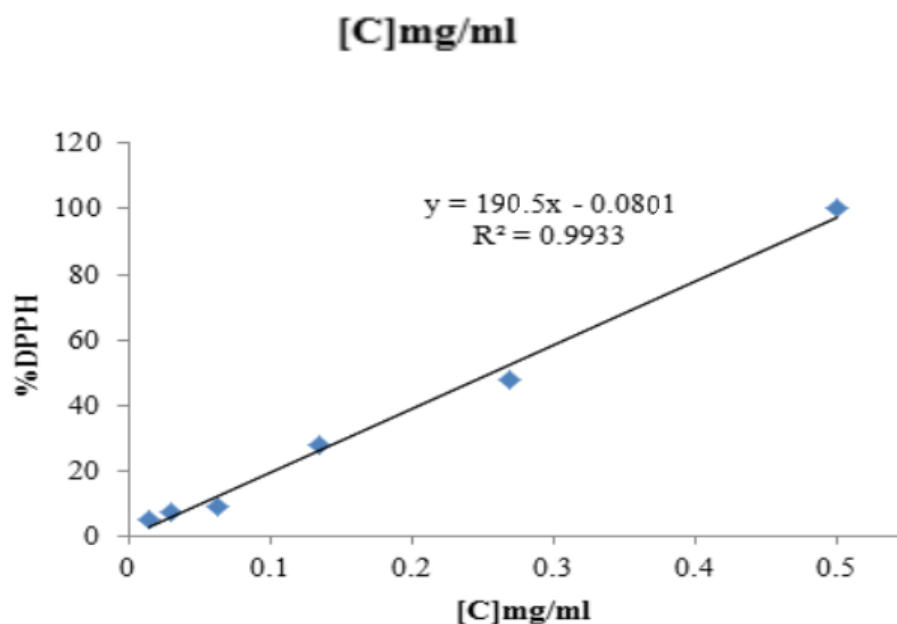
**Flavonoïdes:** Présence est totale dans les trois parties (feuille, tige, rameaux) de la plante.

A la fin de cette étude qualitative des différentes substances bioactives au sein des parties de *limonastruim feei*, nous déduisons l'absence totale des alcaloïdes. Par contre nous remarquons l'existence des autres substances naturelles bioactifs.

### 3. Résultat d'activité antioxydant

Ci- Dessous on discute cas par cas l'évaluation antioxydant pour chaque extrait.

- Pour l'acide Ascorbique



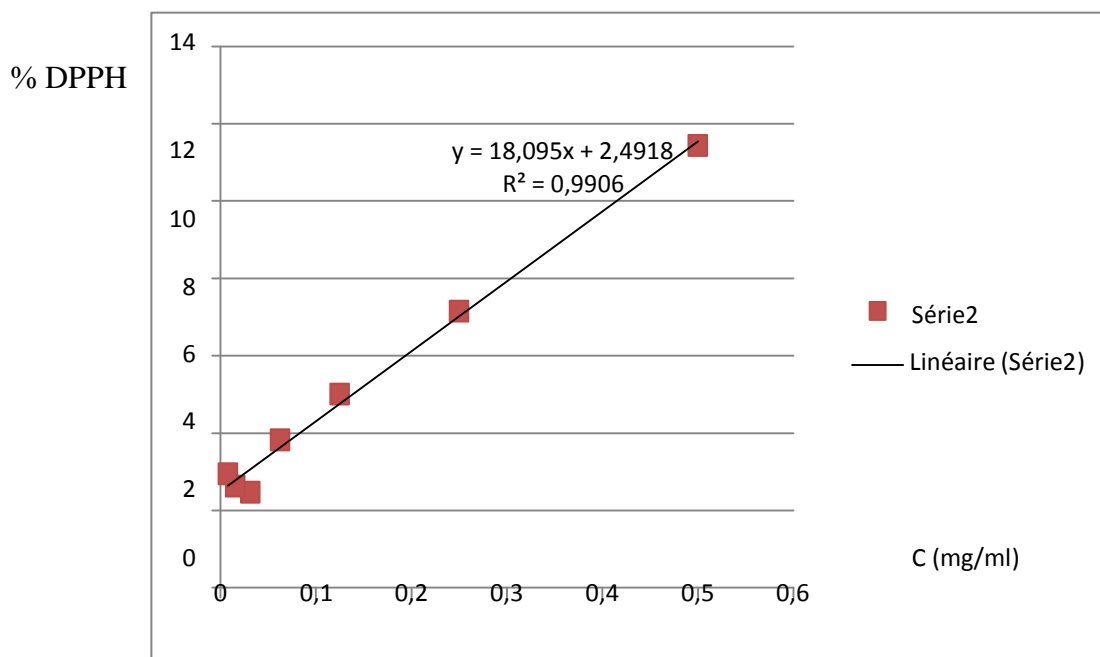
**Figure. 31:** Activité antioxydant d'acide Ascorbique

La lecture de la figure, révèle que la réaction de l'acide ascorbique et les radicaux de DPPH est rapide et instantanée, le changement de couleur du violet au jaune exprime le passage du DPPH de la forme radical ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) à la forme réduite stable ( $\text{DPPH-H}$ )



- **Pour l'extrait méthanolique**

Dans notre étude, nous avons commencé tout d'abord par l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait brut méthanolique de la plante. La figure -32 - illustre les résultats Obtenus.

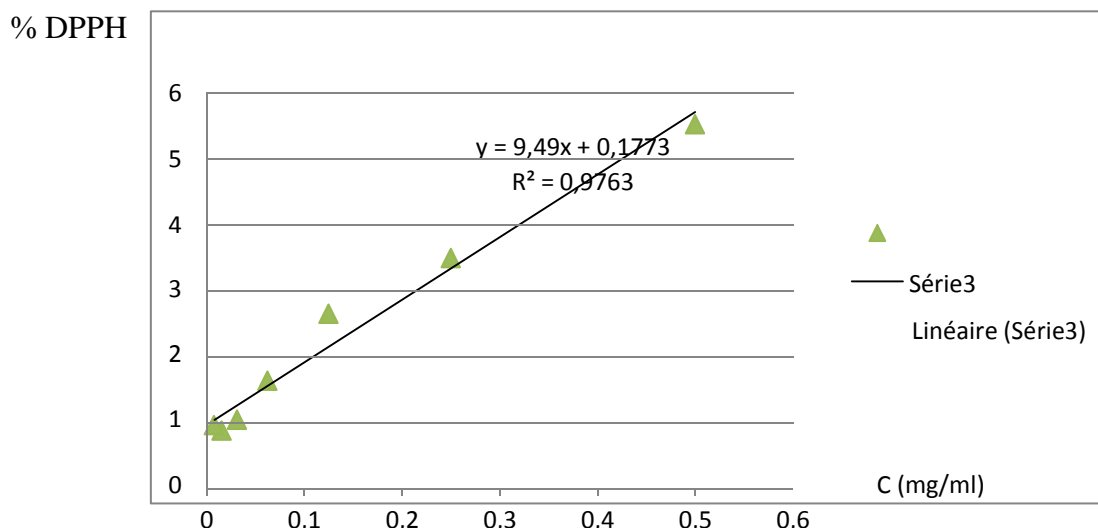


**Figure.32 :** Activité antioxydant d'Extrait méthanolique.

On remarque que l'allure de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration c'est presque une droite de type  $y=a+bx$  avec une bonne corrélation entre les valeurs obtenues  $R^2=0,99$ . La lecture de cette figure montre que le pourcentage d'inhibition ou le piégeage des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait brut méthanolique. En outre, le pouvoir anti-radicalaire observé peut être due aux composés observé peut être due aux composés phénoliques tels que les flavonoïdes, polyphénols, tannins et terpènes phénoliques. La lecture du graphe nous a permis aussi d'estimer la concentration à partir de laquelle 50% des radicaux libres ont été réduits, elle est de l'ordre de 2,626 mg/ml. Cette valeur, confirme bien que notre extrait est doté d'un effet antioxydant puissant.

- **Pour l'extrait d'éther diéthylique**

Dans la deuxième expérience, nous avons testé l'extrait d'éther diéthylique en matière d'activité antioxydant. Cette étude a conduit aux résultats illustrés dans la figure 33

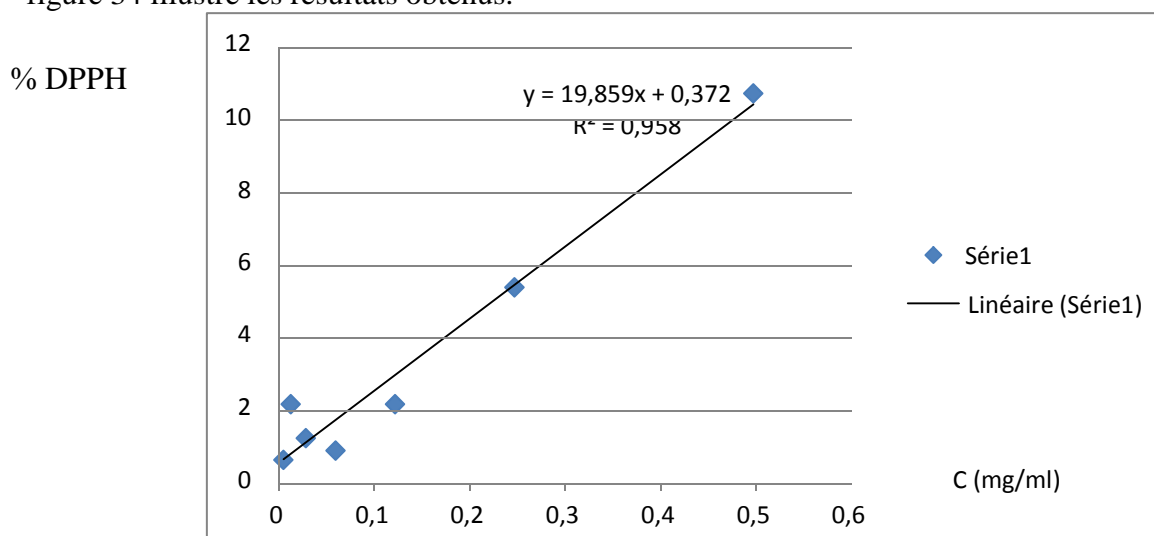


**Figure .33:** Activité antioxydant d'extrait d'éther diéthylique.

On n'observe que le profil de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration c'est presque une droite de type  $y = a + b x$  avec une bonne corrélation entre les valeurs obtenues ( $R^2 = 0,9763$ ). L'analyse du graphe montre également une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition et la concentration, révèle que notre extrait a un pouvoir antioxydant remarquable surtout que son  $IC_{50}$  est de l'ordre de 5,25 mg/ml. Ce résultat constitue un bon support de fiabilité de l'effet antiradicalaire de notre extrait.

▪ **Pour l'extrait d'Acétate d'Ethyle**

Dans la troisième manipulation, l'activité antioxydante a été évaluée pour cet extrait. La figure 34 illustre les résultats obtenus.

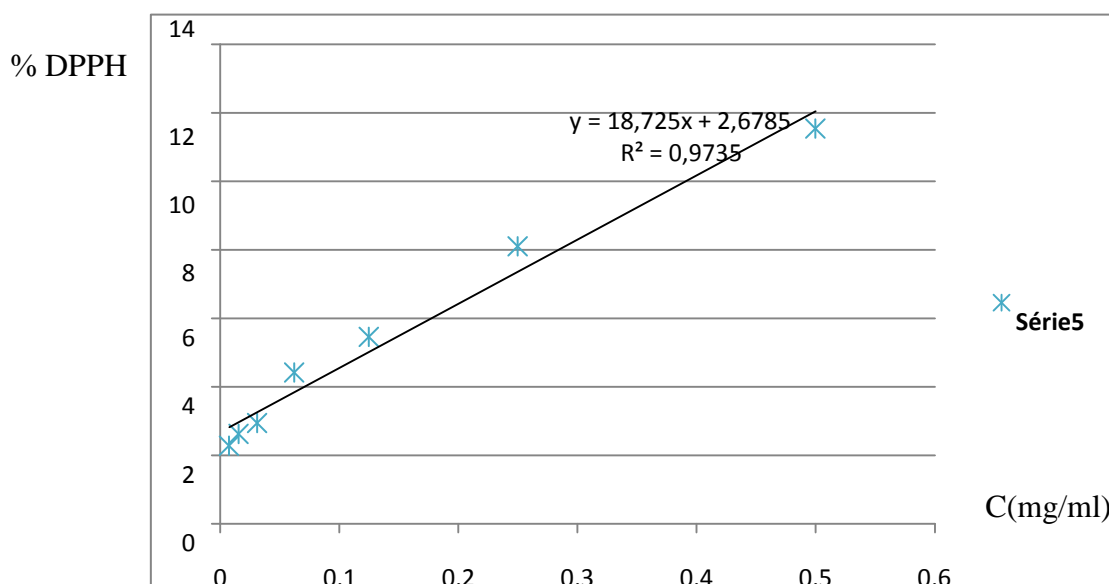


**Figure .34:** Activité antioxydant d'extrait d'Acétate d'Ethyle.

Comme dans les deux cas précédent, le profil de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration c'est presque une droite de type  $y=a +b x$  avec une très bonne corrélation ( $R^2 =0,958$ ). La lecture du graphe montre une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition de DPPH et la concentration d'extrait. Ce résultat montré que notre extrait a un pouvoir antiradicalaire puissant. Cette remarque est justifiée par le calcul de la concentration  $CI_{50}$  qui est de l'ordre de 2,50 mg/ml.

### Pour l'extrait butanolique

Dans la dernière expérience, nous avons testé l'extrait butanolique en matière d'activité antioxydant. La figure 35 illustre les résultats obtenus.



**Figure .35** Activité antioxydant d'extrait butanolique.

Le profil de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration c'est presque une droite de type  $y=a +b x$  avec une très bonne corrélation ( $R^2 =0,9735$ ). La lecture du graphe montre une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition de DPPH et la concentration d'extrait. Ce résultat montré que notre extrait a un pouvoir anti-radicalaire puissant. Cette remarque est justifiée par le calcul de la concentration  $CI_{50}$  qui est de l'ordre de 2,52 mg/ml.

### Calcul des IC50 :

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir des IC50, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH●. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 6 et dans la figure sous forme d'histogramme.

**Tableau 6** : valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour les extraits de *Limoniastrum feei*

	IC <sub>50</sub> exprimées en mg/ml
<b>Extrait méthanolique</b>	2,626
<b>Extrait d'éther diéthylique</b>	5,25
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	2,50
<b>Extrait butanolique</b>	2,52
<b>l'acide Ascorbique</b>	0,14

En comparant les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés de *limoniastrum feei* par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydant élevée de la différente fraction des extraits des feuilles qui est supérieure à la capacité du piégeage du radical DPPH● de l'acide ascorbique.

Nous remarquons en premier lieu que tous nos extraits ont des activités moins importantes que la substance de référence, l'acide ascorbique,

En second lieu, l'extrait Acétate d'éthyle est généralement le plus active par rapport aux autres extraits.

Au sein des extraits on peut les classer selon l'ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : Acide ascorbique > Extrait Acétate d'éthyle > Extrait d'Ether diéthylique > Extrait méthanolique > Extrait butanolique.

### Activité antimicrobienne

#### Lecture de résultat

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée.

Les tableaux suivant résumant les résultats du test d'activité antibactérienne exprimés par les diamètres de la zone d'inhibition en mm

Ou : M : sensibilité moyenne ( $14 < \Phi < 20$ ),

S : très sensible ( $\Phi > 20$ ),

L : sensibilité limité ( $0 < \Phi < 14$ ).

**Tableau 7 : résultats du test antibactérien de l'extrait méthanolique**

Les souches utilisées	les diamètres de la zone d'inhibition en mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	15 M	11 L	10 L	14 M
<i>Escherichia coli</i>	16 M	12 L	12 L	8 L	6 L
<i>Salmonella typhi</i>	11 L	10 L	13 L	11 L	13 L
<i>Citrobacterien fremotri</i>	13 L	14 L	8 L	9 L	12 L

**Tableau 8 : résultats du test antibactérien de l'extrait d'éther diéthylique**

Les souches utilisées	les diamètres de la zone d'inhibition en mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 L	7 L	8 L	6 L
<i>Escherichia coli</i>	10 L	9 L	14 M	13 L	8 L
<i>Salmonella typhi</i>	9 L	14 M	9 L	9 L	7 L
<i>Citrobacterien fremotri</i>	10 L	9 L	7 L	8 L	9 L

**Tableau 9: résultats du test antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle**

Les souches utilisées	les diamètres de la zone d'inhibition en mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 L	7 L	8 L	6 L
<i>Escherichia coli</i>	19 M	9 L	15 M	15 M	6 L
<i>Salmonella typhi</i>	16 M	14 M	10 L	9 L	7 L
<i>Citrobacterien fremotri</i>	11 L	10 L	11 L	11 L	9 L

**Tableau 10 : résultats du test antibactérien de l'extrait butanolique**

Les souches utilisées	les diamètres de la zone d'inhibition en mm				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 L	9 L	7 L	8 L
<i>Escherichia coli</i>	16 M	10 L	15 M	14 M	7 L
<i>Salmonella typhi</i>	14 M	15 M	11 L	8 L	9 L
<i>Citrobacterien fremotri</i>	10 L	11 L	9 L	10 L	10 L

## IV-2. Investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de *Limoniastrum fei*

### IV-2.2. Résultat d'extraction des feuilles

#### a. phase d'éther diéthylique

\* La couleur de la phase éthylique est jaune.

\* la phase éthylique est évaporée à sec et peser donnant 0,1g de résidu sec.

L'analyse chromatographique sur couche mince de la phase est effectuée sur des plaques de silica gel sur feuille d'aluminium (Merck). Après développement dans des cuves en verre,

les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 365 nm, indiquant la présence de 4 spots (tableau 11).

**Tableau 11:** Analyse CCM de la phase étherique (feuille)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm
liquide de couleur jaune	<b>0.2</b>	<b>Ac /toluène/A.formique</b>  (6 / 8 / 1)	<b>4</b>	<b>0.70</b> <b>0.59</b> <b>0.49</b> <b>0.29</b>	Marron clair  Marron clair	Bleu Bleu Bleu Bleu

#### b. phase d'acétate d'éthyle

Les résultats sont classés dans le tableau 12 en indiquant le nombre, la couleur et le Rf des taches d'extrait d'acétate d'éthyle

**Tableau 12:** Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (feuille)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm
solide de couleur jaune foncé	<b>0.5</b>	<b>Ac /toluène/A.formique</b>  (6 / 8 / 1)	<b>5</b>	<b>0.71</b> <b>0.61</b> <b>0.49</b> <b>0.32</b> <b>0.23</b>	Marron clair  Marron clair	Bleu Bleu Bleu Bleu Bleu

### c. phase buthanolique

L'analyse par CCM de la phase buthanolique a présentée dans le tableau suivant :

**Tableau 13:** Analyse CCM de la phase buthanolique (feuille)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M					
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm	
Liquide visqueux de couleur rouge foncé	0.7	Ac /toluène/A.formique  (6 / 8 / 1)	5	0.70	Marron	bleu	
				0.61			
				0.49	Marron clair		bleu
				0.32			bleu
0.23	bleu						

### IV-2.3. Résultat d'extraction des tiges

#### a. phase d'éther diéthylique

Nous avons utilisé le même protocole que précédemment pour 100 g de *limoniastrum feei*.

Les résultats de cette étude d'extraction et analytique sont regroupés dans le tableau suivant.

**Tableau 14:** Analyse CCM de la phase d'éther diéthylique (tige)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 365 nm	
Liquide de couleur jaune clair	0.15	Ac /toluène/A.formique  (6 / 8 / 1)	4	0.75	bleu	
				0.61		
				0.50		bleu
				0.30		bleu

#### b. phase d'acétate d'éthyle

L'analyse par CCM donne les résultats consignés dans les tableaux suivant

**Tableau 15:** Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (tige)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 365 nm	
Liquide de couleur jaune	0.25	Ac /toluène/A.formique  (6 / 8 / 1)	5	0.75	bleu	
				0.64		
				0.51		bleu
				0.35		bleu
0.21	bleu					



**c. phase buthanolique**

d'après les résultats de tableau 16 l'analyse CCM montre cinq constituants dans les tige de *limoniastrum feei*

**Tableau 16:** Analyse CCM de la phase buthanolique (tige)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M			
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 365 nm
Liquide de couleur rouge	0.4	Ac /toluène/A.formique  (6 / 8 / 1)	5	0.76 0.60 0.52 0.30 0.22	bleu bleu bleu bleu bleu

**IV-2.4. Résultat d'extraction des Rameaux**

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le même procédé a été appliqué pour l'extraction des différentes parties de la plante, sauf dans le cas des Rameaux nous avons augmenté le temps d'extraction d'une heure (5 heures d'extraction au lieu de 4 heures).

**a. phase d'éther diéthylique**

Nous présentons dans le tableau 17 l'ensemble des résultats d'extrait d'éther diéthylique

**Tableau 17:** Analyse CCM de la phase étherique (Rameaux)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm
liquide de couleur jaune	0.15	Ac /toluène/A.formique  (6 / 8 / 1)	4	0.56 0.45 0.26 0.16	jaune brun Marron clair Marron clair	Bleu Bleu Bleu bleu

**b. phase d'acétate d'éthyle**

Dans les conditions d'extraction et d'analyse CCM nous présentons dans le tableau 18 les résultats d'extrait d'acétate d'éthyle

**Tableau 18:** Analyse CCM de la phase d'acétate d'éthyle (Rameaux)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm
liquide de couleur rouge	<b>0.31</b>	<b>Ac /toluène/A.formique</b>  (6 / 8 / 1)	<b>4</b>	<b>0.60</b> <b>0.40</b> <b>0.26</b> <b>0.15</b>	jaune brun Marron clair Marron clair	Bleu Bleu Bleu bleu

**c. phase buthanolique**

Les résultats de cette extraction et d'analyse CCM sont regroupés dans le tableau ci-dessous (tableau 19).

**Tableau 19:** Analyse CCM de la phase buthanolique (Rameaux)

Extrait Aspect physique	m (g)	Analyse par C.C.M				
		Eluant	N <sup>bre</sup> des taches	R <sub>f</sub> des taches	fluorescence à 254 nm	fluorescence à 365 nm
liquide de couleur rouge foncé	<b>0.45</b>	<b>Ac /toluène/A.formique</b>  (6 / 8 / 1)	<b>4</b>	<b>0.62</b> <b>0.42</b> <b>0.25</b> <b>0.15</b>	jaune brun - Marron clair	Bleu Bleu Bleu Bleu

## Stratégie de séparation

- 5g de chaque extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle et n-butanol) est repris pour l'analyse chromatographique, dissoudre cette masse avec une petite quantité du méthanol.
- L'extrait brut a été soumis à fractionnée par une chromatographie liquide sur colonne remplie par 30 g du gel de silice.
- L'élution a été effectuée au moyen des différents gradients de chloroforme et le méthanol.
- Les fractions obtenus sont analysées par chromatographie sur couche mince CCM par un système d'éluant : Acétone /toluène/A. formique (6/8/1).

### I.3. Fractionnement et isolement des composés

#### I.3.1. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait Acétate d'éthyle partie Tige.

5 g de l'extrait éther de pétrole ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de gel de silice (0.20 mm). L'élution a été réalisée par un gradient de solvants organiques composé du Chloroforme et du méthanol.

11 fractions ont été recueillies puis regroupées suivants leur similitude sur plaque CCM et révélation avec 10 % d'acide sulfurique dans l'éthanol. Les fractions sont ensuite séchées sous pression réduite. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 20.

**Tableau 20.** Résultats de fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle

Fractions	Eluant de la colonne	Observation en CCM
1	Chloroforme pur Chloroforme/ Méthanol	Mélange séparable (faible quantité)
2	90 / 10	Néant
3	80 / 20	Mélange séparable
4	70 / 30	Mélange séparable
5	60 / 40	Mélange complexe
6	50 / 50	Néant complexe
7	40 / 60	Néant
8	30 / 70	Néant
9	20 / 80	Néant
10	10 / 90	Traînée
11	Méthanol pur	

**Tableau 21.** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle

Fractions	Nom de la fraction	Observation en CCM
1-15	3-1	Néant
16-25	3-2	Néant
26-34	3-3	Traînée + Deux taches
35-46	3-4	Mélange complexe
47-58	3-5	Mélange complexe
59-71	3-6	Traînée + Deux taches
72-83	3-7	Traînée
<b>84-95</b>	<b>3-8</b>	<b>Tache jaune</b> Deux
96-109	3-9	tache + Traînée
110-123	3-10	Mélange complexe
124-142	3-11	Deux taches majoritaires + Traînée

L'analyse chromatographique sous la lumière UV des fractions 3-8, montre la présence d'une seule tache de couleur jaune, donc c'est un produit séparé nommé **C1** qui possède les caractéristique suivant:

Aspect physique: solide jaune.

Le rapport frontal  $R_f = 0.49$

Poids (g): 0.35

Codes donnés: C1

Température de fusion  $T_f = 163\text{ C}^\circ$

## I.3.2. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait Acétate d'éthyle partie feuille

Tableau 22. Résultats de fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle

Fractions	Eluant de la colonne	Observation en CCM
1	Chloroforme pur Chloroforme/ Méthanol	Mélange de Trois taches
2	90 / 10	Mélange complexe
3	80 / 20	Mélange complexe
4	70 / 30	Mélange complexe
5	60 / 40	Néant
6	50 / 50	Néant
7	40 / 60	Néant
8	30 / 70	Néant
9	20 / 80	Néant
10	10 / 90	Néant
11	Méthanol pur	Mélange séparable

Tableau 23. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle

Fractions	Nom de la fraction	Observation en CCM
1-10	1-1	Néant
11-18	1-2	Traînée Mélange
19-20	1-3	complexe Traînée
29-40	1-4	<b>Une seule Tache</b>
<b>41-52</b>	<b>1-5</b>	<b>Une seule Tache</b>
<b>53-68</b>	<b>1-6</b>	Traînée
69-85	1-7	Tache majoritaire +Traînée
86-100	1-8	

Le produit obtenu de la sous-fraction 1-5 est purifié sur colonne de gel de séphadex LH-20 et 14 mg du produit C2 ont été récoltés.

La sous-fraction 1-6 est chromatographiée sur des plaques préparatives de gel de silice, en utilisant le système d'élution Acetone /toluène/A.formique (6/8/1)

Après purification sur colonne de gel de séphadex LH-20 éluée avec le méthanol, évaporation à sec et séchage, nous avons obtenu 12 mg du produit C3.

- Pour les caractéristique de produit C2

Aspect physique: solide marron.

Le rapport frontal Rf = 0.71

Poids (g): 0.14

Codes donnés: C2

Température de fusion Tf = 189 C°

- Pour les caractéristique de produit C3

Aspect physique: solide marron.

Le rapport frontal Rf = 0.61

Poids (g): 0.12

Codes donnés: C3

Température de fusion Tf = 150 C°

**Tableau 24.** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle

Fractions	Nom de la fraction	Observation en CCM
1-14	11-1	Néant
15-25	11-2	Néant
26-35	11-3	Traînée + Deux taches
36-46	11-4	Mélange complexe
47-58	11-5	Mélange de Trois taches
<b>59-71</b>	<b>11-6</b>	<b>Une seule Tache</b>
72-85	11-7	Traînée
<b>85-97</b>	<b>11-8</b>	<b>Tache jaune</b> Deux
98-109	11-9	tache + Traînée
110-123	11-10	Mélange complexe
124-142	11-11	Deux tache + Traînée

La sous-fraction 11-6 issue de la séparation précédente montre en CCM sur gel de silice éluée avec le système Acetone /toluène/A.formique (6/8/1) et après révélation à la lumière UV (254 nm, 365 nm) une tache jaune bien distincte correspondant au produit majoritaire de Rf= 61 (11mg) C3. Et la sous-fraction 11-8 est soumise à une chromatographie sur plaque CCM le produit obtenu C4 de Rf= 0.49 (22 mg) est purifié sur colonne de séphadex LH-20.

- Pour les caractéristique de produit C4

Aspect physique: solide marron.

Le rapport frontal  $R_f = 0.49$

Poids (g): 0.22

Codes donnés: C4

Température de fusion  $T_f = 152\text{ C}^\circ$

### I.3.3. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait n-Butanol partie Rameaux

**Tableau 25.** Résultats de fractionnement de l'extrait n-Butanol

Fractions	Eluant de la colonne	Observation en CCM
1	Chloroforme pur Chloroforme/ Méthanol	Deux taches
2	90 / 10	Néant Mélange
3	80 / 20	séparable Mélange
4	70 / 30	complexe Deux
5	60 / 40	taches + traînée Une
6	50 / 50	tache + traînée Néant
7	40 / 60	Néant Mélange
8	30 / 70	séparable Néant
9	20 / 80	Néant
10	10 / 90	
11	Méthanol pur	

**Tableau 26.** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-Butanol

Fractions	Nom de la fraction	Observation en CCM
1-7	5-1	Néant
8-19	5-2	Une tache + traînée
20-31	5-3	Petite tache + traînée
32-40	5-4	Petite tache + traînée
41-49	5-5	Petite tache + traînée
<b>50-65</b>	<b>5-6</b>	<b>Une seule tache</b>
66-73	5-7	Traînée + Petite tache
74-88	5-8	Mélange de quatre taches
89-96	5-9	Mélange de quatre taches
97-102	5-10	Mélange de quatre taches
103-110	5-11	Mélange de quatre taches
111-125	5-12	Tache majoritaire + Une petite tache marron

La sous-fraction 5-6, montrant en CCM un composé majoritaire a été chromatographiée sur des plaques préparatives de gel de silice le système éluant Acétone /toluène/A. formique (6/8/1) pour donner 11 mg du produit C5 de  $R_f = 0.40$

- Pour les caractéristiques de produit C5

Aspect physique: solide jaune clair.

Le rapport frontal  $R_f = 0.61$

Poids (g): 0.11

Codes donnés: C5

Température de fusion  $T_f = 192\text{ C}^\circ$

**II. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés** Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques, particulièrement la UV-visible, IR, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ainsi que la spectrométrie de masse.

#### **IV-4. 2. Spectrophotométrie Infra-Rouge (IR-TF)**

Quelques mg de la substance analysée sont mélangés avec quelques mg de bromure de potassium finement pulvérisé et desséché. Ces quantités suffisent généralement pour préparer une pastille et obtenir un spectre d'intensité satisfaisante.

Le mélange est soigneusement broyé, étendu uniformément dans une matrice spéciale et soumis à une haute pression, pour obtenir une pastille adéquate.

Dans le tableau ci-après, nous présentons les bandes d'absorption IR, avec leur attribution pour l'ensemble des composés étudiés.



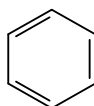
Tableau 27.

<b>Bande IR</b> <b>Composés séparés</b>	<b>v O-H</b>	<b>v =C-H arom</b>	<b>v C-H</b>	<b>v C=O ester</b>	<b>v C=O α, β insaturé</b>	<b>v C=C</b>	<b>v C=C arom</b>	<b>δ CH3</b>	<b>δ O-H</b>	<b>v C-O α, β insaturé</b>	<b>v C-O</b>	<b>δ =C-H arom</b>	<b>δ CH2</b>
<b>C1</b>	3541-3475 3415-3229	/	2956 2923 2852	1738	1640	1607	/	1454	1377	1263 1159	1093	879 820 621	/
<b>C2</b>	3546-3415 3333-3224	3102			1656 1634	1607 1508	/	1459	1377	1153	1022	625	727
<b>C3</b>	3415-3229	/	2956 2852		1640	/	/	1454	1377	1263	1093	610	/
<b>C4</b>	3315	/	2913	/	1656	1608	/	1483	1308	1153	1022	836 774 616	/
<b>C5</b>	3546-3464 3410-3235	/	2929 2918 2847	/	1640	1612	1547 1525	1448	1377	1241 1137	1061 1039	854 825 775	/

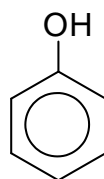
L'absorption assez intense vers  $3400\text{ cm}^{-1}$ , nettement visible dans les spectres infrarouge, est une bande de valence OH.

Nous pouvons penser à l'existence d'un groupement aliphatique en raison de la vibration de valence C–H située à  $2956\text{ cm}^{-1}$  et  $2847\text{ cm}^{-1}$  ; le pic du spectre infrarouge à  $1377\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'un groupement tertio butyle – CH – (groupement glucoside).

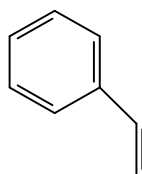
Nous remarquons aussi des pics intenses entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  et  $1454\text{ cm}^{-1}$  et quelques pics assez importants dans la région des basses fréquences (grandes longueurs d'onde) qui caractérisent les cycles aromatiques



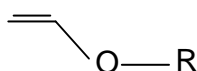
Nous remarquons l'absence des vibrations de valence de C–H aromatiques qui sont cachées par les bandes larges de l'alcool aromatique



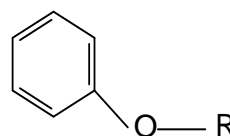
Des pics intenses vers  $1601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1607\text{ cm}^{-1}$  et  $1612\text{ cm}^{-1}$  caractérisent d'ailleurs des liaisons éthyléniques C=C qui peuvent être conjuguées



Les bandes qui se situent entre  $1022\text{ cm}^{-1}$  et  $1121\text{ cm}^{-1}$  caractérisent des éthers oxyde aliphatiques CH<sub>3</sub>-O –, et les bandes vers  $1153\text{ cm}^{-1}$  et  $1263\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées à un éther oxyde conjugué



OU



Le spectre IR présente un pic d'absorption vers  $1730\text{ cm}^{-1}$  et  $1738\text{ cm}^{-1}$  dû à un groupement carbonyle qui est probablement en présence d'un système conjugué : nous avons le choix entre une cétone et un ester.

Les bandes carbonyles situées vers  $1618\text{ cm}^{-1}$  et  $1656\text{ cm}^{-1}$  correspondent à une cétone  $\alpha, \beta$  insaturée (conjuguée)



D'après les analyses des spectres infrarouges des composés séparés, nous constatons que nous avons des flavanoides glycosidiques.

## II.1. Elucidation de la structure du composé C1

### II.1.a. Propriétés physico-chimiques

Le composé C1 se présente sous forme d'un solide jaune, soluble dans le méthanol.

### II.1.b. Données spectroscopiques

Le composé C1 obtenu de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des tiges de *limonastruim feei*.

### Spectroscopie UV / VIS de C1

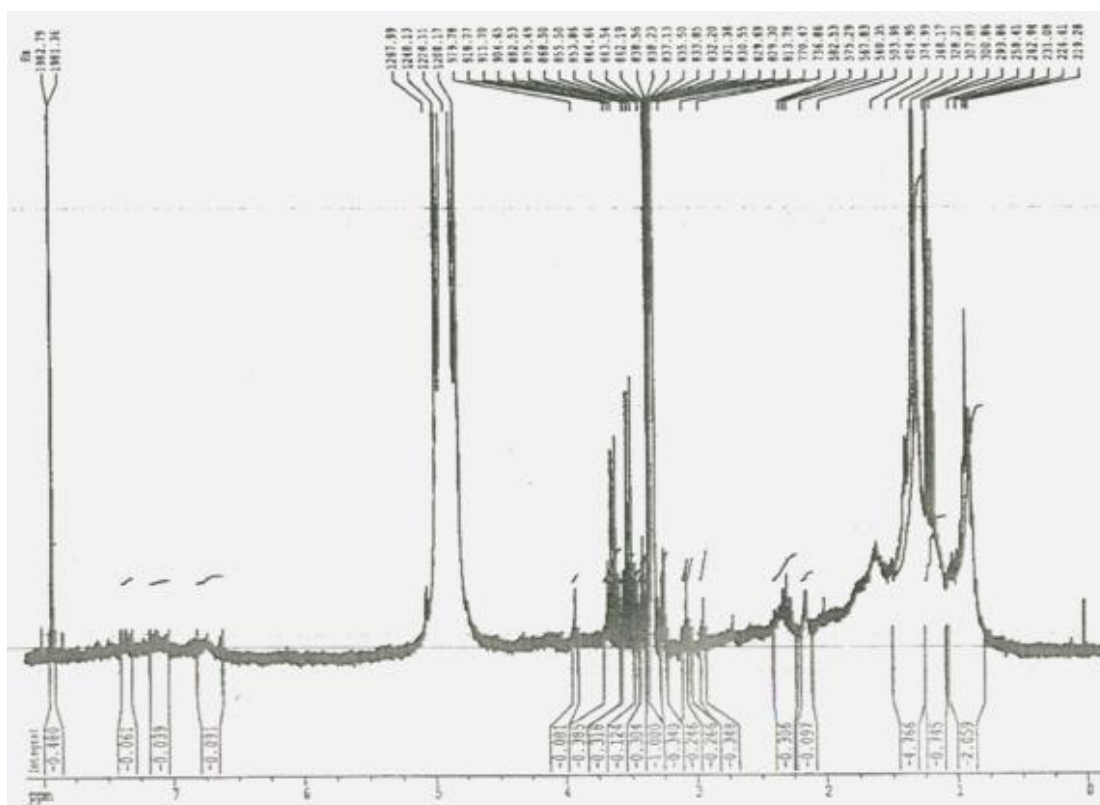
**Tableau 28** : Résultat d'UV de composé C1

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	333	263 – 270 - 285
+ AlCl <sub>3</sub>	+ 400	270 épaulements
+ AlCl <sub>3</sub> / H <sup>+</sup>	+ 400	270 épaulements
+ MeONa	+ 400	270 épaulements
+ AcONa	+ 400	270 épaulements

L'ajout de l'acétate de sodium induit un déplacement bathochrome de bande I (+400 nm) dans le spectre UV, ce qui montre la présence d'un groupe hydroxyle en position 7 et l'apparition d'une seconde bande maximum I (+400 nm) observée avec le réactif  $\text{AlCl}_3$ , est révélateur d'un déplacement bathochrome induit par 5-OH [78].

Par rapport à ce spectre, l'addition de la solution  $\text{AlCl}_3 / \text{H}^+$  montre un déplacement bathochrome de la bande I (+400 nm), ce qui indique la présence de deux groupes ortho-hydroxyyles sur le cycle B. Le spectre UV obtenu avec le MeONa permet d'observer la présence d'un groupe hydroxyle en position 5.

#### d) – RMN $^1\text{H}$ de composé C1( 250 MHz , MeOH d4 )



**Figure 36:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé C1

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux sont présentés comme suit :

RMN $^1\text{H}$  : 6.72 (s, H-3), 2.29 (dd, H-9<sup>a</sup>, H-9<sup>b</sup>), 1.31 (m, H-10), 1.23 (dt, H-11<sup>a</sup>, H-11<sup>b</sup>), 1.20 (m, H-12, 2H), 1.17 (m, H-13), 0.92 (d, H-14 et H-16, 6H), 2.16 (d, H-15, 3H) , 7.35 (dd , H-2'),

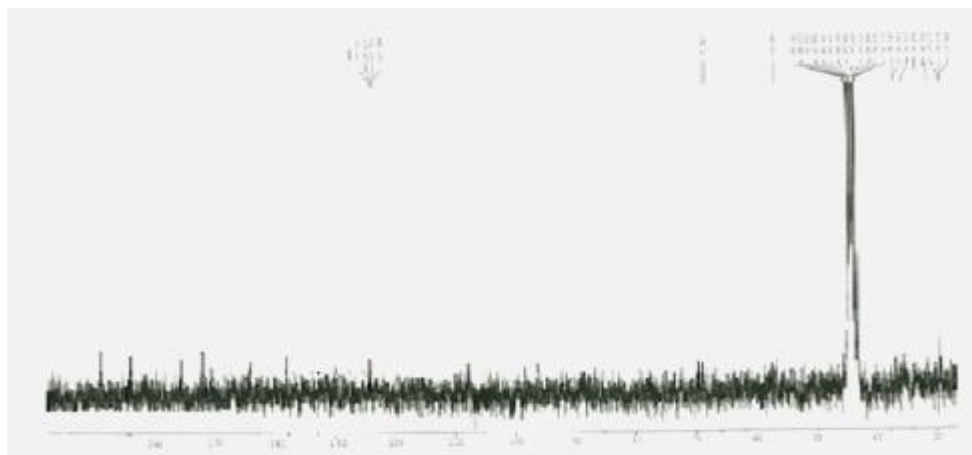
7.12(d, H-5'), 7.92(dd, H-6'), 4.83(H-1''), 3.91(m,H-2''), 3.50(d,J=7Hz,H-3''), 3.37(d,J=9.2Hz,H-4''), 3.10(m,H-5''), 3.61(dd,J=7, 1.6Hz,H-6''a), 3.41(dd,J=7, 1.6Hz,H-6''b).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de composé C1 montre un signal à 6.72 (singlet) dû à H – 3. Nous avons comparé ce résultat avec les travaux de Waridel (2003) [1] qui indiquent la présence de 3'-OH et 4'-OH dans le composé C1 due à des signaux  $\delta_{\text{H}}$  : 7.12 pour H – 5',  $\delta_{\text{H}}$  : 7.35 pour H – 2' et  $\delta_{\text{H}}$  : 7.92 pour H – 6'.

Les signaux caractéristiques de diméthyl – 2,5 – hexyl ont été observés à 1.31 ( d , 2H , H , 9 ) , 2.29 ( m , 1H , H – 10 ) , 1.23 ( t , 2H , H – 11 ) , 1.20 ( t , 2H , H – 12 ) , 2.16 ( m , 1H , H – 13 ) , 1.17 ( d , 3H , H – 15 ) , et 0.92 ( d , 3H , H – 14 et H – 16 ) .

La localisation de ce groupement a été basée par RMN  $^{13}\text{C}$ .

e) – RMN  $^{13}\text{C}$  de composé C1(250 MHz, MeOH d4)



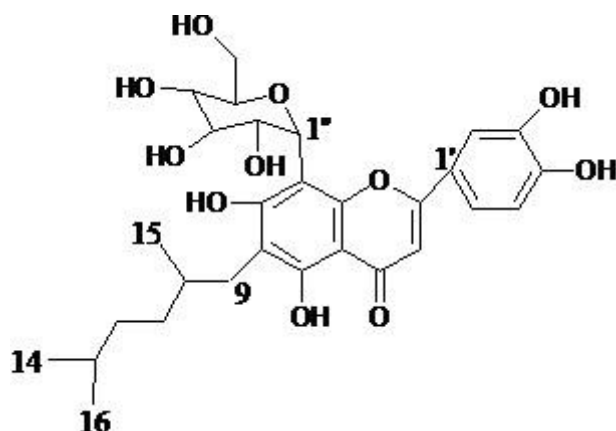
**Figure 37:** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C1

Les déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  et les attributions des signaux observés sont comme suit :

RMN  $^{13}\text{C}$  : 165.32(C-2), 103(C-3), 173(C-4), 156.14(C-5), 128.6(C-6), 163.41(C-7), 105,1(C-8), 150.73(C-8a), 104.2(C-4a), 31.63(C-9), 36.92(C-10), 38.75(C-11), 38.50(C-12), 34.20(C-13), 29.00(C-14), 29.27(C-15), 29.18(C-16), 127.75(C-1'), 115.62(C-2'), 148.21(C-3'), 150.3(C-4'), 123.21(C-5'), 127.38(C-6'), 73.51(C-1''), 76.35(C-2''), 78.02(C-3''), 70.20(C-4''), 81.12(C-5''), 63.30(C-6'')

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de composé C1 indique la présence de 14 atomes, 10 atomes (0 – 100) et 4 (< 100) , avec les caractéristiques suivantes : présence des glucosides :  $\delta$  : 78 et  $\delta$  : 63

Après la combinaison entre ces données, la structure que nous proposons est la suivante :



6-diméthyle 2,5 hexyl-8-C-glucopyranoside -5,7,3',4'hydroxyflavone  
**Figure 38:** Structure du composé C1

## II.1. Elucidation de la structure du composé C2

### II.1.a. Propriétés physico-chimiques

Le composé C2 se présente sous forme d'un solide marron, soluble dans le méthanol.

### II.1.b. Données spectroscopiques

Le composé C2 obtenu de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des feuilles de *limonastruim feei*.

### Spectroscopie UV / VIS de C2

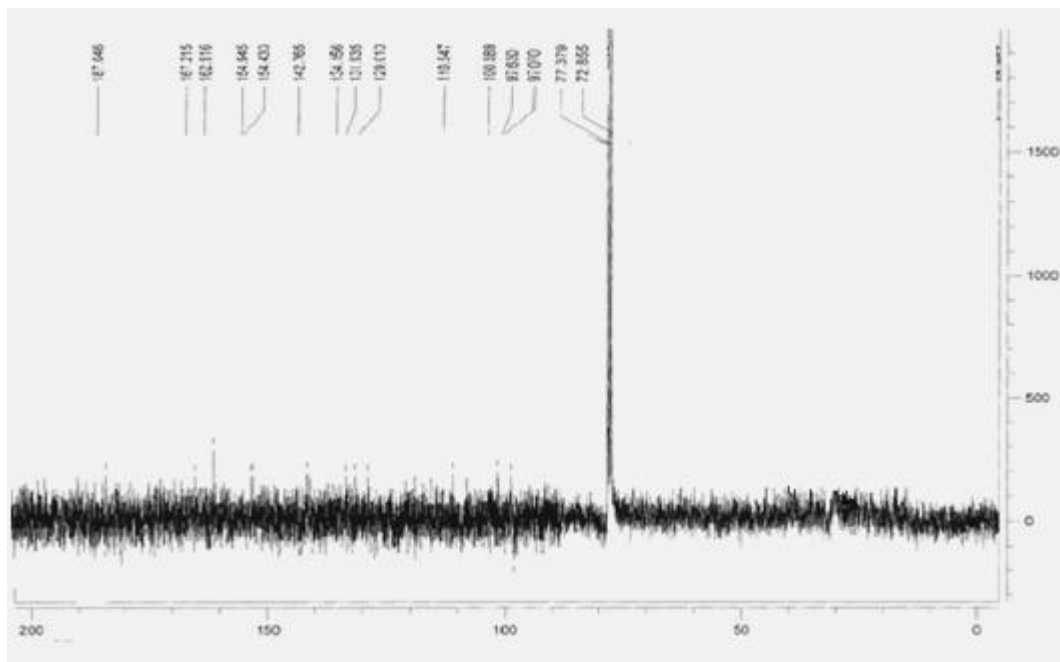
**Tableau 29:** Résultats d'UV de composé C2

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	350	262 – 270
+ AlCl <sub>3</sub>	+ 400	270 épaulements
+ AlCl <sub>3</sub> / H <sup>+</sup>	+ 400	270 épaulements
+ MeONa	+ 400	270
+ AcONa	+ 400	270 épaulements

L'ajout d'un réactif d'AlCl<sub>3</sub> indique un déplacement bathochrome de la bande I (+ 400 nm), ce qui montre la présence d'un groupe hydroxyle en position 5 selon les résultats obtenus avec l'addition de MeONa. L'apparition d'un second maximum dans la bande I à



e) – RMN <sup>13</sup>C de composé C2( 250 MHz , MeOH d4 )



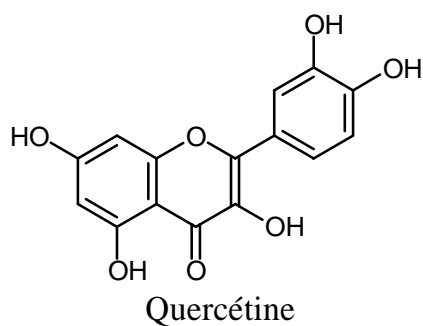
**Figure 41:** Spectres RMN <sup>13</sup>C du composé C2

Les déplacements chimiques en RMN C<sup>13</sup> et les attributions des signaux observés sont comme suit :

RMN <sup>13</sup>C: 154.5(C-2), 128.11 (C-3), 187.48(C-4), 162.16(C-5), 97.6(C-6), 167.21(C-7), 97(C-8), 154.33(C-9), 109(C-10), 131.34(C-1'), 110.47(C-2'), 142.18(C-3'), 134.15(C-4'), 118(C-5'), 129.13(C-6').

ESI-MS/MS m/z: 303 137 149 153 165.

Après la combinaison de différentes données spectroscopiques, nous proposons la structure suivante :



**Figure 42:** Structure du composé C2



## II.1. Elucidation de la structure du composé C3

### II.1.a. Propriétés physico-chimiques

Le composé C3 se présente sous forme d'un solide marron, soluble dans le méthanol.

### II.1.b. Données spectroscopiques

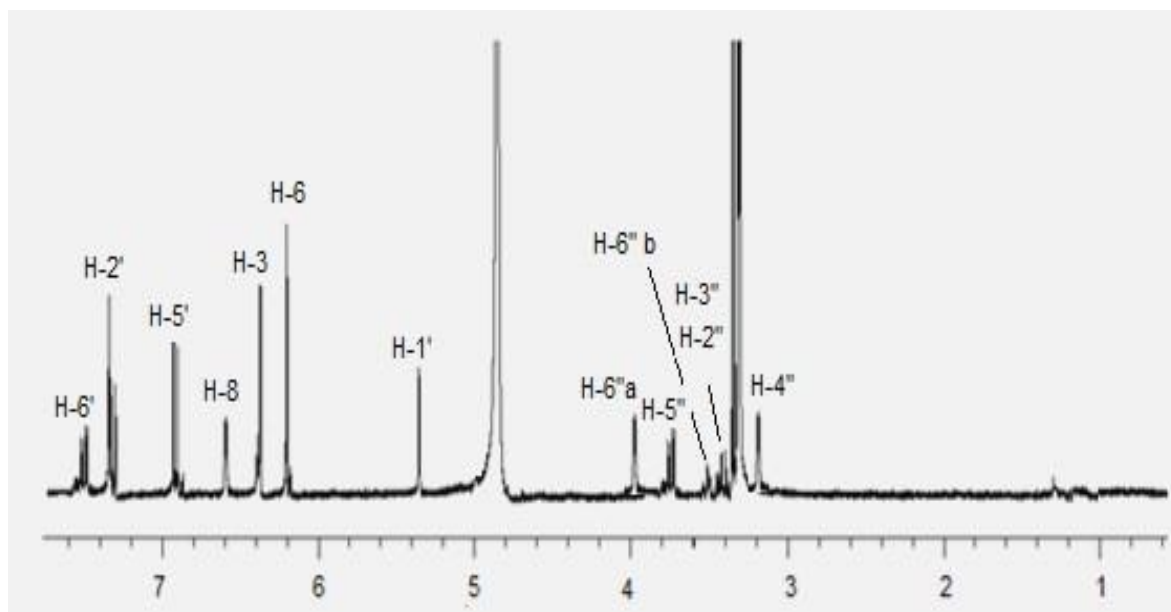
Le composé C3 obtenu de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des feuilles de *limonastruim feei*.

## Spectroscopie UV / VIS de C3

**Tableau 30** : Résultats d'UV de composé C3

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH (0)	360	250 - 276
+ AlCl <sub>3</sub> (1)	+ 400	276 épaulements
+ AlCl <sub>3</sub> / H <sup>+</sup> (2)	+ 400	250 - 276
+ MeONa (3)	+ 400	250 - 276
+ AcONa (4)	360	250 - 276

L'ajout d'un réactif d'AlCl<sub>3</sub> indique un déplacement bathochrome de la bande I (+ 400 nm), ce qui montre la présence d'un groupe hydroxyle en position 5 selon les résultats obtenus avec l'addition de MeONa. L'apparition d'un second maximum dans la bande I à (+400 nm), observé avec le réactif AlCl<sub>3</sub> / H<sup>+</sup>, est révélateur d'un déplacement bathochrome induit par deux groupes ortho-hydroxyles sur le cycle B, c'est-à-dire en position 3' et 4'. En effet le spectre UV obtenu avec l'AcONa permet d'observer l'absence d'un groupe hydroxyle en position 7.

RMN  $^1\text{H}$  de Composé C3

**Figure 43:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé C3

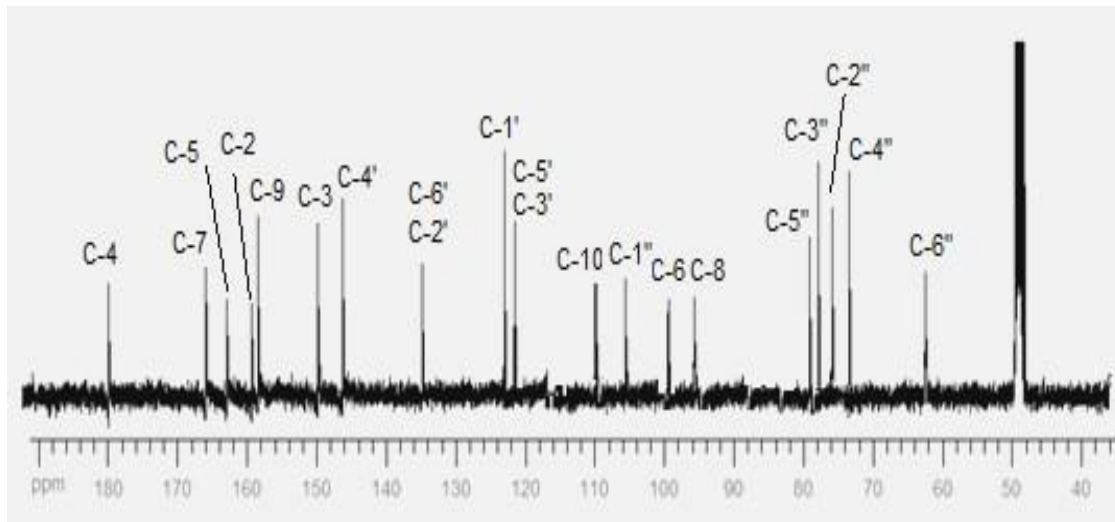
RMN  $^1\text{H}$ : 6.41 (H-3), 6.19 (H-6), 6.58 (H-8), 7.26 (H-2', m), 6.94 (H-5', d,  $J=8.4$  Hz), 7.35 (H-6', d,  $J=8.4$  Hz), 5.37 (H-1'), 3.27 (H-2''), 3.35 (H-3'', m), 3.20 (H-4), 3.73 (H-5'', m), 3.45 (H-6''a), 4.98 (H-6''b, m).

Deux protons aromatiques à 6.19 ppm (H-6) et 6.58 ppm (H-8) dans le cycle A.

Et pour le cycle B avec trois protons à savoir :

un signal doublet résonant à 6.94 ppm (H-5', d,  $J=8.4$  Hz) dû à un couplage ortho), un deuxième résonant à 7.26 ppm (H-2') et le dernier doublet résonant à 7.35 (H-6',  $J=8.4$  Hz).

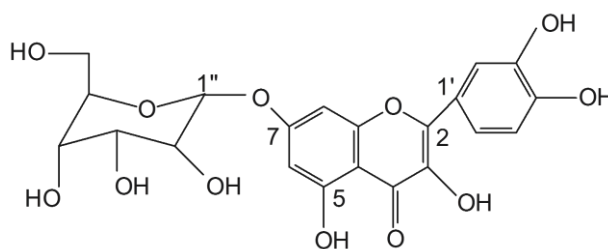
Le cycle C avec un seul proton aromatique à 6.41 ppm (H-3).

RMN  $^{13}\text{C}$  de Composé C3

**Figure 44:** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C3

RMN  $^{13}\text{C}$ : 159.78 (C-2), 151.36 (C-3), 180.46 (C-4), 163.89 (C-5), 99.65 (C-6), 166.50 (C-7), 95.51 (C-8), 158.27 (C-9), 110.15 (C-10), 123.11 (C-1'), 135.25 (C-2', C-6'), 122.70 (C-3', C-5'), 147.37 (C-4'), 106.12 (C-1''), 75.14 (C-2''), 78.10 (C-3''), 73.52 (C-4''), 79.02 (C-5''), 62.89 (C-6'').

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  on dénombre 21 atomes de carbones dont six résonant à (ppm): 106.12, 75.14, 78.10, 73.52, 79.02, 62.89. Ces valeurs sont relatives aux carbones C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'' d'un 7-O-glucoside



**Figure 45:** Structure du composé C3

## II.1. Elucidation de la structure du composé C4

### II.1.a. Propriétés physico-chimiques

Le composé C4 se présente sous forme d'un solide marron, soluble dans le méthanol.

### II.1.b. Données spectroscopiques

Le composé C4 obtenu de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des feuilles de *limonastruim feei*.

### Spectroscopie UV / VIS de C4

**Tableau 31** : Résultats d'UV de composé C4

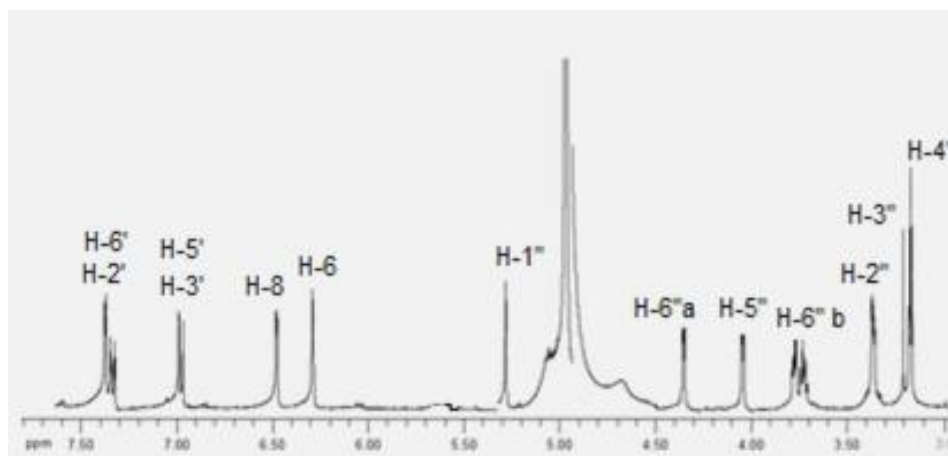
Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH (0)	360	246 – 270
+ AlCl <sub>3</sub> (1)	+ 400	270 épaulements
+ AlCl <sub>3</sub> / H <sup>+</sup> (2)	360	270
+ MeONa (3)	+ 400	270 épaulements
+ AcONa (4)	+ 400	270 épaulements

L'addition de la solution d'AlCl<sub>3</sub> montre un déplacement significatif des maxima de la bande I, ce qui indique la présence d'un groupe hydroxyle en position 5.

Le spectre UV avec AlCl<sub>3</sub> / H<sup>+</sup> ne montre pas de déplacement significatif des maxima de la bande I, ce qui indique l'absence des deux groupes ortho-hydroxyles libres sur le cycle B.

L'ajout de l'acétate de sodium induit un déplacement bathochrome de bande I (+400 nm) dans le spectre UV, ce qui montre la présence d'un groupe hydroxyle en position 7 et, l'addition de MeONa confirme la présence d'un groupe hydroxyle en position 5.

### RMN $^1\text{H}$ de Composé C4



**Figure 46:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé C4

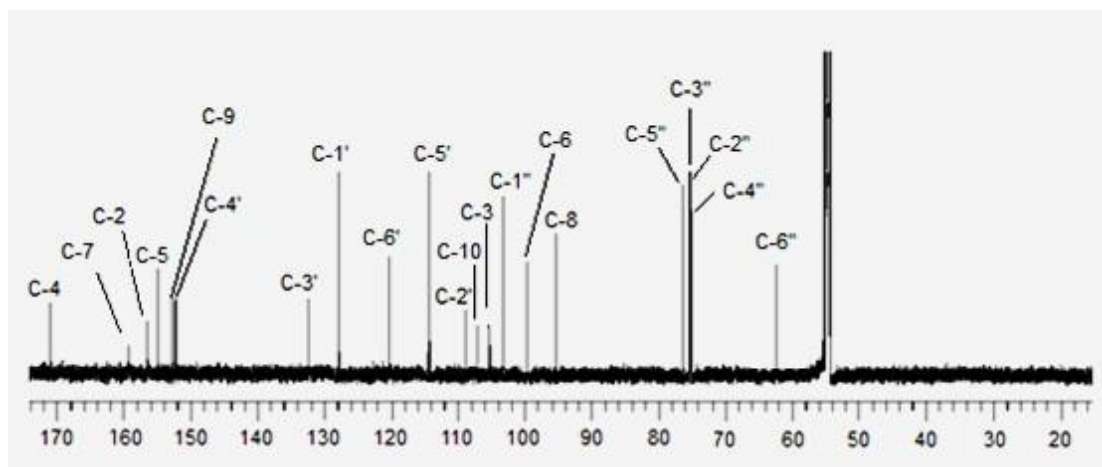
RMN  $^1\text{H}$ : 6.31 (H-6), 6.50 (H-8), 7.34 (H-2', H-6', m), 6.98 (H-3', H-5', d), 5.27 (H-1''), 3.39 (H-2''), 3.21 (H-3''), 3.16 (H-4, m), 4.06 (H-5'', m), 3.75 (H-6''a, m), 4.34 (H-6''b).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques : les protons à  $\delta$  6,31 et 6,50 caractéristiques du cycle A des flavonoïdes (H-6 et H-8).

Dans le cycle B, les déplacements chimiques à  $\delta = 7,34$  ppm d'intégration pour 2H correspondent aux protons équivalents H-2'/H-6' et à  $\delta = 6,98$  ppm correspond aux protons équivalents H-3'/H-5'.

Nous observons un signal d'un proton anomérique à  $\delta_{\text{H}}$  5.27 ppm, ainsi que d'autres signaux dans l'intervalle 4.34-3.16 ppm confirmant la présence d'un sucre.

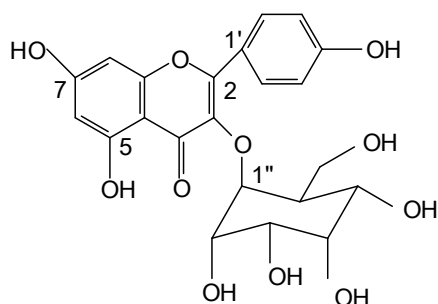
### RMN $^{13}\text{C}$ de Composé C4



**Figure 47:** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C4

RMN  $^{13}\text{C}$ : 157.88 (C-2), 106.36 (C-3), 171.46 (C-4), 156.19 (C-5), 99.35 (C-6), 169.10 (C-7), 96.50 (C-8), 153.17 (C-9), 107.55 (C-10), 129.10 (C-1'), 110.45 (C-2'), 132.70 (C-3'), 152.17 (C-4'), 115.32 (C-5'), 121.30 (C-6'), 104.52 (C-1''), 74.44 (C-2''), 75.10 (C-3''), 73.82 (C-4''), 76.32 (C-5''), 63.60 (C-6'').

La présence du groupement glucosyle est confirmée par la RMN  $^{13}\text{C}$  qui permet de distinguer les signaux suivants : 104.52 (C-1''), 74.44 (C-2''), 75.10 (C-3''), 73.82 (C-4''), 76.32 (C-5''), 63.60 (C-6''), en plus des signaux caractéristiques des carbones flavoniques.



**Figure 48:** Structure du composé C4

## II.1. Elucidation de la structure du composé C5

### II.1.a. Propriétés physico-chimiques

Le composé C5 se présente sous forme d'un solide jaune clair, soluble dans le méthanol.

### II.1.b. Données spectroscopiques

Le composé C5 obtenu de la fraction de butanol de l'extrait méthanolique des rameaux de *limonastruim feei*.

## Spectroscopie UV / VIS de C5

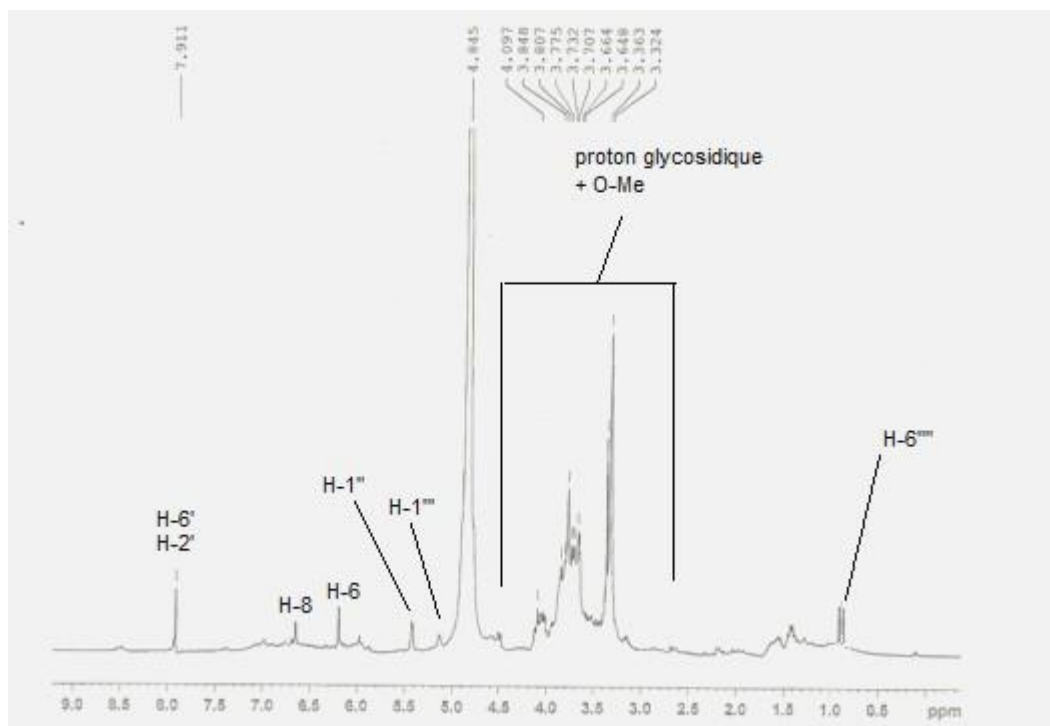
Tableau 32 : Résultats d'UV de Composé C5

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	355	260 – 269
+ AlCl <sub>3</sub>	+400	270 épaulements
+ AlCl <sub>3</sub> / H <sup>+</sup>	355	260 – 269
+ MeONa	+ 400	270 épaulements
+ AcONa	+ 400	270 épaulements

L'absorption maximale des rayonnements UV vers  $\lambda = 268$  et 355 nm montre la présence des groupements fonctionnels.

L'ajout de l'acétate de sodium induit un déplacement bathochrome de bande I (+400 nm) dans le spectre UV, ce qui montre la présence d'un groupe hydroxyle en position 7 et l'apparition d'une seconde bande maximum I (+400 nm), observée avec le réactif AlCl<sub>3</sub>, est révélateur d'un déplacement bathochrome induit par 5-OH [78].

Par rapport à ce spectre, l'addition de la solution AlCl<sub>3</sub> / H<sup>+</sup> montre l'absence de deux groupes ortho-hydroxyles sur le cycle B. Le spectre UV obtenu avec le MeONa permet d'observer la présence d'un groupe hydroxyle en position 5.

RMN  $^1\text{H}$  de Composé C 5

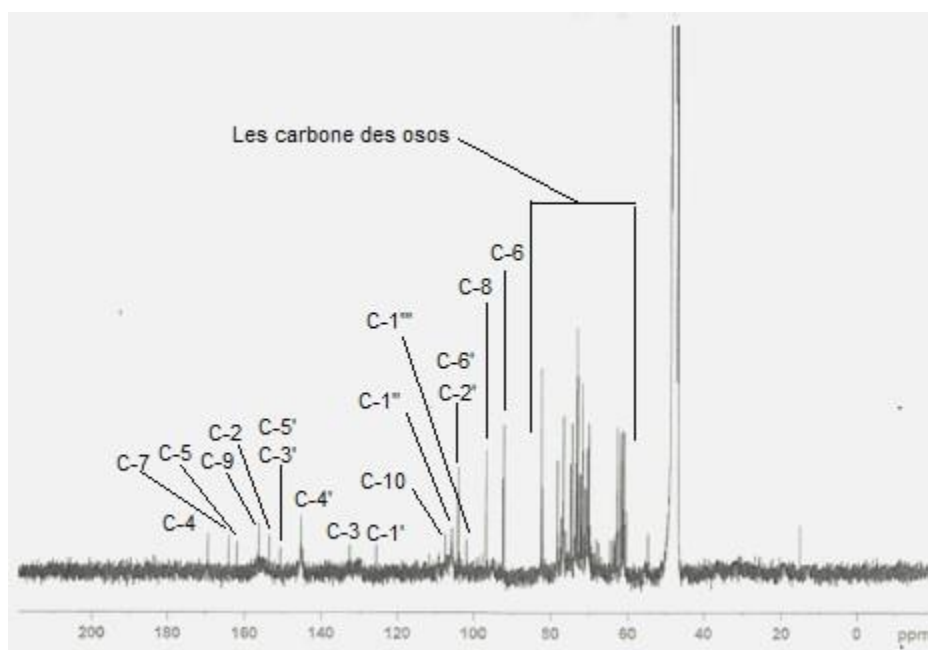
**Figure 49:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé C5

RMN  $^1\text{H}$ : 6.23 (H-6), 6.68 (H-8), 7.87 (H-2', H-6'), des signaux entre  $\delta = 5.42$  et 3.20 ppm indiquent la présence de deux sucres.

Dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit C5, on observe un signal résonant à  $\delta = 6.68$  ppm et un autre à  $\delta = 6.23$  ppm respectivement, dus aux protons H-8 et H-6. Le singulet observé à  $\delta = 7.87$  ppm est dû à la résonance de H-2' et H-6'.

L'apparition de deux signaux à  $\delta = 5.42$  et 5.09 ppm sont caractéristiques d'un proton anomérique et les signaux entre  $\delta = 4.11$  et 3.20 ppm indiquent la présence d'un sucre lié à l'aglycone par le carbone-3.

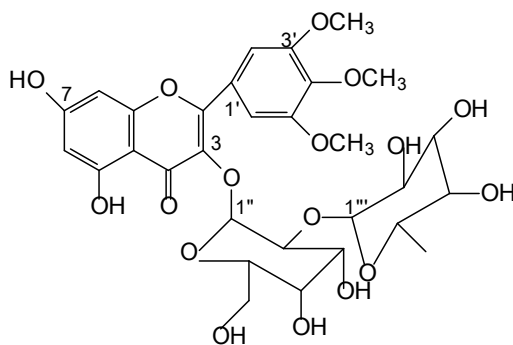


RMN  $^{13}\text{C}$  de Composé C 5

**Figure 50:** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C5

RMN  $^{13}\text{C}$ : 156.28 (C-2), 133.30 (C-3), 170.41 (C-4), 162.19 (C-5), 98.5 (C-6), 167.21 (C-7), 96.30 (C-8), 157.7 (C-9), 109.25 (C-10), 126.1 (C-1'), 105.45 (C-2'), 151.32 (C-3'), 144.37 (C-4'), 151.32 (C-5'), 105.45 (C-6'), 107.2 (C-1''), 81.54 (C-2''), 76.10 (C-3''), 73.12 (C-4''), 76.02 (C-5''), 63.60 (C-6''), 103.2 (C-1'''), 78.54 (C-2'''), 74.10 (C-3'''), 72.92 (C-4'''), 77.2 (C-5'''), 62.20 (C-6''), 55,2 61,84 et 61,13 O-CH<sub>3</sub>)

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  montre également les signaux caractéristiques du sucre dans la zone  $\delta = 81-62$  ppm. Le blindage de C-3 ( $\delta 133$  ppm) et le déblindage des carbones C-2 ( $\delta 156$  ppm) et C-4 ( $\delta 170$  ppm) comparativement à l'aglycone, suggèrent que la position d'attache du sucre avec l'aglycone se situe sur le carbone C-3



**Figure 51:** Structure du composé C5

## II.6. Conclusion

*Limoniastrum feei*, plante endémique du sud-ouest algérienne, à usage importantes dans la médecine traditionnelle dans la région, pour le traitement des affections gastrique, hépatique et les Rhums.

A l'issue de ce travail, il ressort que les propriétés antibactériennes et antioxydantes de *limoniastrum feei* sont vraisemblablement liées à l'occurrence des flavonoïdes.

La méthode de fractionnement sur colonne de gel de silice particulièrement simple et rapide a mettre en œuvre nous a permet une purification performante des extraits bruts.

Les composés présents dans les extraits méthanoliques (polaires) ont été isolés, mais cinq d'entre eux ont pu être identifiés par UV, IR RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Une majorité de ces constituants sont des flavonoïdes connus, des dérivés glycosylés.



***CONCLUSION  
GENERALE***

## Conclusion générale

Dans le cadre de la recherche des molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères, le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle. L'objet de notre travail a porté sur l'étude phytochimique des extraits organiques de la partie aérienne de *Limoniastrum feei*, utilisé dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement des troubles gastro-intestinaux.

Le choix de la plante est basé sur quelques données ethno-pharmacologiques.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes, saponosides et cardenolides dans la partie aérienne de la plante.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des extraits organiques de *Limoniastrum feei*.

En effet, les tests antibactériens des extraits réalisés in vitro par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton sur quatre souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Citrobacterium freundii*.) ont montré que l'extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité modérée contre *E. coli* et *S. typhi* et une faible activité contre *S. aureus*. En revanche l'extrait méthanolique a présenté une bonne activité vis-à-vis des quatre bactéries.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques, éther diéthylique, acétate d'éthyle et butanolique par la méthode de piégeage de radical libre DPPH, a montré que l'extrait butanolique présente un pouvoir antioxydant plus important que ceux des autres extraits.

Au cours de nos travaux, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires de cette espèce. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince et sur colonne).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques spectroscopiques incluant la spectroscopie UV-Visible, la spectroscopie infrarouge (IR-TF) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ).

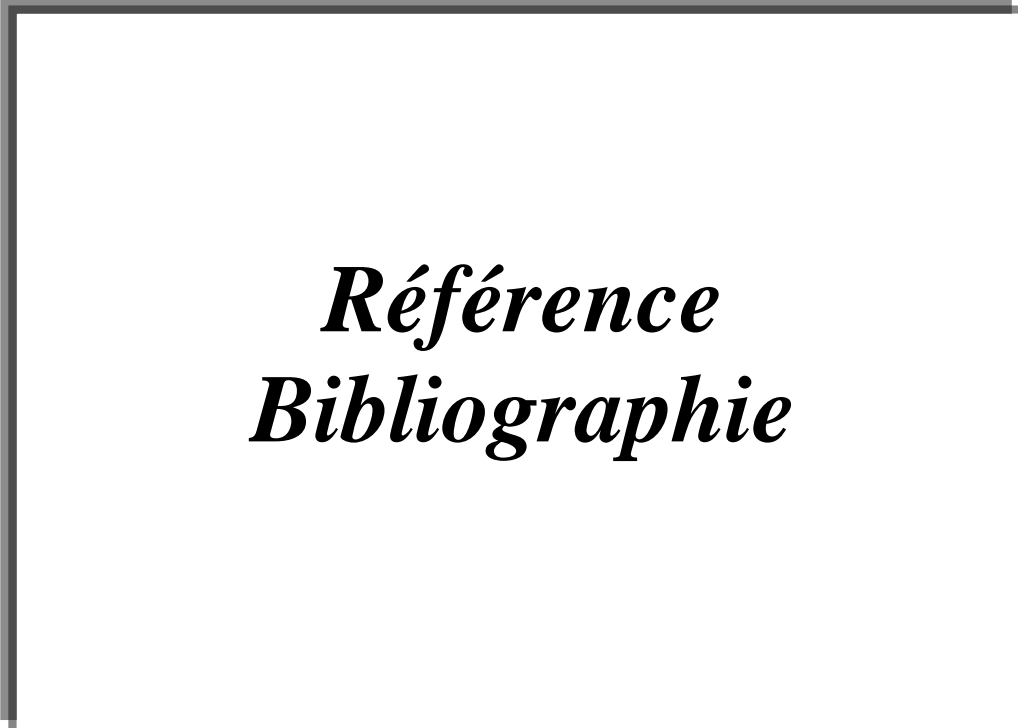
L'étude phytochimique menée sur *Limoniastrum feei* a permis donc l'isolement de cinq composés: 6-diméthyle 2,5 hexyl-8-C-glucopyranoside -5, 7,3' ; 4'hydroxylflavone, Quercetin, Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Astragalin), Quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside et 3',4',5'tri-méthoxy Kaempferol-3-O- $\beta$ -rutinoside

Ces résultats apportent des éléments de validation scientifique de l'usage traditionnel des plantes médicinales pour leur activité antibactérienne en particulier pour le traitement gastriques par la population du sud algérien.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- élargir le panel des activités antimicrobiennes et antioxydantes in vitro et in vivo,
- élargir le travail pour d'autres activités biologiques telles que : l'activité cytotoxique, antitumorale et anticancéreuse,
- évaluation antimicrobienne des composés purs isolés.

Enfin, ce travail apporte une contribution phytochimique à la connaissance de la plante et permet ainsi, de mieux comprendre les propriétés antibactériennes des extraits de *Limoniastrum feei*.



*Référence*  
*Bibliographie*

## Bibliographie

- [1] P. Waridel "Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* *Potamogetonaceae*", (2003), Thèse de doctorat, LAUSANNE
- [2] Vania G.Zuin et Jenete. H.Y.Vilegas. *Phytoterapy research*. 14. 73-88 (2000)
- [3] F.Ben Ayache "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaire d'espes de genre *genista* (*fabaceae*)". Thèse de doctorat
- [4] A. Belabbesse étude phytochimique du *launiae nudicaulus* mémoire de Magister Centre Universitaire de Bechar 2008
- [5] Brahim Harkati Doctorat En Sciences 2011, Valorisation Et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera Undulata*. UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE.
- [6] Pifferi G et Vitali R. " *Medicines from plants* ". *Chim. Ind.* (1993). 75, 382-384.
- [7] Ziane Laid Etude Phytochimique Des Extraits Bioactifs De *Limoniastrum Feei* - *Blombaginaceae*- (Melefet El Khadem) mémoire de Magister Centre Universitaire de Bechar 2007
- [8] Konemann. "Guide illustré du Bien-être", phytothérapie.(1999). Édition française P 6-10-12
- [9] C. Duraffourd, J.C.Lapraz et R.Chemli. "La plante médicinale de la traduction à la science ". 1<sup>er</sup> congrès intercontinental-Tunis de l'usage empirique à la phytothérapie clinique. (1997). P 201-222-261-271-312.
- [10] J. David Phillipson. " *Phytochemistry and medicinal plants*". *Phytochemistry* 56 (2001) 237-243.
- [11] M. Ya. Lovkova, G. N. Buzuk, S. M. Sokolova, and N. I. Kliment'eva. " *Chemical Features of Medicinal Plants (Review)* " *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 37, No. 3, (2001), pp. 229–237.
- [12] Joao B. Calixto, Alessandra Beirith, Juliano Ferreira, Adair R. S. Santos, Valdir Cechinel Filho and Rosendo A. Yunes. "Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants" *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 14. 401–418 (2000).
- [13] Jean –Louis Guignard. "Biochimie végétale ". 2<sup>e</sup> édition. Dunod, Paris (2000). P 155-157-158.

- [14] M.T.L. Ielpo, A. Basile, R. Miranda, V. Moscatiello, C. Nappo, S. Sorbo, E. Laghi, M.M. Ricciardi, L. Ricciardi, M.L. Vuotto. "Immunopharmacological properties of flavonoids ". *Fitoterapia* 71 (2000). S101-S109
- [15]. Mothes, K. and Schutte, H., *Biosynthese Der Alkaloide*, Berlin: VEB Dtsch. Verl. Wiss, (1969).
- [16]. Lovkova, M.Ya, "Biosintez i metabolizm alkaloidov v rasteniyakh (Alkaloids Biosynthesis and Metabolism in Plants)", Moscow: Nauka, (1981).
- [17]. Zaprometov, M.N., "Fenol'nye soedineniya (Phenolic Compounds)", Moscow: Nauka, (1993).
- [18]. Paseshnichenko, V.A., *Biosintez i "biologicheskaya aktivnost' rastitel'nykh terpenoidov i steroidov (Biosynthesis and Biological Activity of Plant Terpenoids and Steroids)"*, *Itoги Nauki Tekh., Ser.: Biol. Khim.*, Moscow: VINITI, (1987).
- [19] J.Elks, "Steroid Saponins and Sapogenins, Amsterdam". Elsevier, (1971)
- [20] N. Rathishi et S. chanda. "anticandidal activity of punica granatum exhibited in different solvents". *Pharmaceutical biology*. (2005). vol 43.N° 1, pp 21- 25
- [21] J. L. Rios et M. C. Recio. " Medicinal plants and antimicrobial activity ". *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 80–84
- [22] J. Roberto Villagomez-Ibarra, Maricruz Sanchez, Ofelia Espejob, Armida Zuniga-Estrada, J. Martin Torres-Valencia, Pedro Joseph-Nathan. "Antimicrobial activity of three Mexican Gnaphalium species " *Fitoterapia* 72 (2001) 692-694
- [23] A. S. Okoli, M. I. Okeke, C. U. Iroegbu and P. U. Ebo. " Antibacterial Activity of *Harungana madagascariensis* Leaf Extracts " *phytotherapy research*. 16, 174–179 (2002)
- [24] Iqbal Ahmad, Zafar Mehmood, Faiz Mohammad." Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties" *Journal of Ethnopharmacology* 62 (1998) 183–193
- [25] Nancy E. Hernandez, M.L. Tereschuk, L.R. Abdala." Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi´ del Valle (Tucuma´n, Argentina) ". *Journal of Ethnopharmacology* 73 (2000) 317–322



- [26] N. Hamidi H. A. Lazouni , A. Moussaoui , L. Ziane , M. Djellouli , A. Belabbesse  
Ethnopharmacology, Antibacterial and Antioxidant Activities, Phytochemical Screening  
of Bioactive Extracts From the Aerial Parts of *Fagonia Longispina* Asian Journal of  
Natural & Applied Sciences Vol. 3(3) September 2014
- [27] Yashodharan Kumarasamy, Philip John Cox, Marcel Jaspars, Lutfun Nahar c,Satyajit  
Dey Sarker." Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity" Journal of  
Ethnopharmacology 83 (2002) 73-77
- [28] Yashodharan Kumarasamy, Philip John Cox, Marcel Jaspars, Lutfun Nahar c,Satyajit  
Dey Sarker." Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity" Journal of  
Ethnopharmacology 83 (2002) 73-77
- [29] V. Kott, L. Barbini, M. Cruanes, J. de D. Munoz, E. Vivot, J. Cruanes,V. Martino, G.  
Ferraro, L. Cavallaro, R. Campos. Journal of Ethnopharmacology 64 (1999) 79–84
- [30] Yana M. Syah , Sjamsul A. Achmad, Emilio L. Ghisalberty , Euis H. Hakim , Didin  
Mujahidin. " Two new cytotoxic isoprenylated flavones,artoindonesianins U and V, from  
the heartwood of *Artocarpus champeden* " Fitoterapia 75 (2004) 134–140
- [31] Monica Rosa Loizzo, Giancarlo A. Statti, Rosa Tundis, Filomena Conforti,  
Sebastiano Ando, Francesco Menichini. Fitoterapia 75 (2004) 577– 580
- [32] Mitsue Haraguchi, Yoshihiro Mimaki, Mario Motidome, Hiroshi Morita,Koichi Takeya,  
Hideji Itokawa, Akihito Yokosuka, Yutaka Sashida. Phytochemistry 55 (2000) 715 -720
- [33] Silvia Marquina, Nora Maldonado, MarõÂ a Luisa GardunÄ o-RamõÂ rez, Eduardo  
Aranda, MarõÂ a Luisa Villarreal, VõÂ ctor Navarro, Robert Bye,Guillermo Delgado,  
Laura Alvarez. Phytochemistry 56 (2001) 93-97
- [34] Francoise Lohezic-Le Devehata, Sophie Tomasia, Didier Fontanelb and Joe l Boustiea.  
Z. Naturforsch. 57c, 1092-1095 (2002);
- [35] Eun-Kyoung Seoa, Mansukh C. Wania, Monroe E. Walla, Hernan Navarroa,  
Rabindranath Mukherjeeb, Norman R. Farnsworthc, A. Douglas Kinghornc.  
Phytochemistry 55 (2000) 35-42
- [36] Appolinary Kamuhabwa, Charles Nshimo, Peter de Witte. Journal of  
Ethnopharmacology 70 (2000) 143–149
- [37] Chee Yan Choo, Kit Lam Chan, Teng Wah Sam, Yukio Hitotsuyanagi, Koichi Takeya.  
Journal of Ethnopharmacology 77 (2001) 129–131

- [38] Catherine Vonthron-Sénécheau, Bernard Weniger, Modibo Ouattara, Fezan Tra Bi, Alphonse Kamenana, Annelise Lobstein, Reto Brun, Robert Anton. *Journal of Ethnopharmacology* 87 (2003) 221–225
- [39] Jonathan Addae-Kyereme, Simon L. Croft, Howard Kendrick, Colin W. Wright. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (2001) 99–103
- [40] B. Kameswara Rao, P. Renuka Sudarshan, M.D. Rajasekhar, N. Nagaraju, Ch. Appa Rao " Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan induced diabetic rats ". *Journal of Ethnopharmacology* 85 (2003) 169–172
- [41] N.S.Sangwan, Shuti Shamker, Rajender S. Sangwan et Sushil Kumar "plant- derived products as antimutagens ". *phytotherapy Research*, vol 12, 389-399 (1998)
- [42] João. B. Calixto, Alessandra Beirith, Juliano Ferreira, adau R. S. Santos, valldir cechinel filho et rosendo A. Yunes. "Naturally occurring antinociptive substances from plants ". *phytotherapy Research*, 14, 401-418 (2000).
- [43] Vatsouro.K et Michtchenko.G, " réactions chimiques classées par auteurs ", éditions de Moscou (1981)
- [44] John R. Dean "Extraction of organic pollutants from environmental matrices: Selection of extraction technique " *trends in analytical chemistry*, (2000) vol. 19, no. 9
- [45] Z. Laid, A. Belabbes " Etude phytochimique et évaluation biologiques de la plante *Limoniastrum feei* " Mémoire d'ingénieurat juin (2003).
- [46] Saleh Bachir Ramadane et Soumer Toufik. "Criblage phytochimique et évaluation biologique de quelques plantes médicinales de la région de Béchar". Mémoire d'ingénieurat (2002).
- [47] J.-L. Guignard Et L. Cosson "Abrégé de Phytochimie" MASSON, Paris, 1985. p 128, 129, 143 et 148.
- [48] Jean – Louis Guignard "Biochimie Végétale" 2<sup>e</sup> édition, DUNOD, Paris, 2000. p 63, 86, 157, 171et177
- [49] M. Ya. Lovkova, G. N. Buzuk, S. M. Sokolova, and N. I. Kliment'eva. "Chemical Features of Medicinal Plants (Review)" *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 37, No. 3, (2001), pp. 229–237.

- [50] P. Jean Bruneton "pharmacognosie, Phytochimie, plante médicinales" 3<sup>ème</sup> Ed, Paris, Edition médicales internationales Tec & Doc Lavoisier, 1999. p 1120
- [51] A. MARFAK "Radiolyse gamma des flavonoïdes "Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides" (2003), Thèse de doctorat, Université de Limoges
- [52] Melle Amélie LHUILLIER " Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* baker (ericaceae), *tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *embelia concinna* baker (myrsinaceae)" (2007) Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse
- [53] Harborne J B. "Methods in plant biochemistry: plant phenolics, Academic press, London UK (1989).
- [54] T Bahorun, "Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle" Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius 83-94 AMAS 1997.
- [55] Kristiina Pelli et Marika Lyly VTT Biotechnology Finlande: "Les antioxydants dans l'alimentation" Institut National de la Recherche Agronomique, France juin 2002.
- [56] Compt rendu du 1<sup>er</sup> colloque sur l'application de polyphénols 22 avril 2004. Société Française des antioxydants 2004.
- [57] Melle LARAOUI Habiba "Etude phytochimique de l'extrait chloroformique de *Bupleurum Atlanticum*" (2007), mémoire magistère, Univ. Hadj Lakhdar, BATNA.
- [58] MILANE Hadi "La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques" (2004), Thèse de doctorat, Univ. Louis Pasteur
- [59] S. Bani, A. Kaul, B. S. Jaggi, K. A. Suri, O. P. Suri, O. P. Sharma "Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex" *Fitoterapia* 71 (2000) 655-662.
- [60] J.L. Rios., M.C. Recio "Medicinal plants and antimicrobial activity" *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 80-84
- [61] M.T.Escribano et autres "polyphenol extraction from foods"

- [62] Roger M. Smith "Before the injection modern methods of sample preparation for separation techniques ". Journal of Chromatography A, 1000 (2003) 3–27
- [63] Xuejun Pan, Huizhou Liu , Guanghe Jia , Youn Yuen Shu "Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root". Biochemical Engineering Journal 5 (2000) 173–177
- [64] Béatrice Kaufmann and Philippe Christen. "Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction ". Phytochem. Anal. 13, 105–113 (2002)
- [65] E.Sreedevi et J.T.Rao. Fitoterapia 71 (2000) 392-394
- [66] Aderbal F. Magalhaes, Ana Maria A. Tozzi, Eva G. Magalhaes, Marisa A. Nogueira, Sonia C.N. Queiroz. "Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots " Phytochemistry 55 (2000) 787-792
- [67] Davyson de L. Moreira, Elsie F. Guimaraes et Maria Auxiliadora C. Kaplan" A C-glucosylFavone from leaves of *Piper lhotzkyanum* " Phytochemistry 55 (2000) 783-786
- [68] Fathy M.Soliman, Afaf H.Shehata, Amel E. Khaleel et Shahera M. Ezzat. Molucules (2002), 7, 245-25
- [69] Christophe Long, Pierre Sauleau, Bruno David, Catherine Lavaud, Valérie Cassabois, Frédéric Ausseil et Georges Massiot. Phytochemistry 64 (2003) 567–569.
- [70] Marie-Laure Crublet, Christophe long, venet, Hamid A.Hadi, Catherine Lavaud de Se de Thierry. Phytochemistry 64 (2003) 589–594
- [71] Abiy Yenesew, Martha Induli, Solomon Derese, Jacob O. Midiwo, Matthias Heydenreich, Martin G. Peter, Hoseah Akala, Julia Wangui, Pamela Liyala, Norman C. Waters. Phytochemistry 65 (2004) 3029–3032
- [72] Maria A. Ponce, José M. Scervino, Rosa Erra-Balsells, Juan A. Ocampo, Alicia M. Godeas. Phytochemistry 65 (2004) 3131–3134
- [73] Bassomo, M.Y., Pegnyemb, D.E., Ngo Mbing, J. Atchade, D.T., Tih, R.G., Sondengam, B.L., Blond, A et Bodo, B. "flavonoides isoles des feuilles de *ochna afzelii* et hemisynthese des afzelodines a, bet c a partir de la dihydrolophirone " Science and Engineering Series Vol. 5, No. 1, pp. 101 – 108 (2004)
- [74] Musa Chacha, Gomotsang Bojase-Moleta, Runner R.T.Majinda " Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stemwood of *Erythrina latissima* ". Phytochemistry 66 (2005) 99–104

- [75] Marcos B. Machado, Lucia M.X. Lopes. "Chalcone–flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*". *Phytochemistry* 66 (2005) 669–674
- [76] Bonaventure T. Ngadjui , Jean Watchueng , Felix Keumedjio , Bathelemy Ngameni , Ingrid K. Simo, Berhanu M. Abegaz . " Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*". *Phytochemistry* 66 (2005) 687–692
- [77] Latifou Lagnika " Etude phytochimique et activite biologique de substances naturelles isolees de plantes beninoises" universite louis pasteur strasbourg faculte de pharmacie (2005)
- [78] D.R.Browning, "méthodes spectroscopique", masson édition, 120, Boulevard saint-germain, parisVier (1974), p13, 34, 75
- [79] R. Freeman " Molecular Smtlictireby Two-Dimensional NMR specirscopy " *Journal of Molecular Structure*, 173 (1988) 17-30
- [08] Manfred Hesse, Herbert Meier et Bernd Zeeh "Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique" MASSON, Paris, 1997.
- [81] A. Linard, H.-J & Quemine et R. Paris "Plantes malgaches N° XXI sur les flavonoides du *xyris semfusca ta* (xyridacées)" *Plantes rtiédicinales et phytothérapie* 1976, Torne X , 11' 4, p . 267-275.
- [82] Siniša Đorđević, Milorad Cakić, Salameh Amr "The extraction of Apigenin and Luteolin from the sage *Salvia Officinalis* l. from Jordan" *Working and Living Environmental Protection* Vol. 1, No 5, 2000, pp. 87 – 93
- [83] [Ma et al., 1997]. Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H., and Claeys M. (1997) Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(12), 1357-1364.
- [84] Stobiecki, 2000] Stobiecki M. (2000) Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54(3), 237-256.
- [85] Wolfender et al., 2000]. Wolfender J.L., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J., and Hostettmann K. (2000) Evaluation of Q-TOFMS/MS and multiple stage IT-MS<sub>n</sub> for

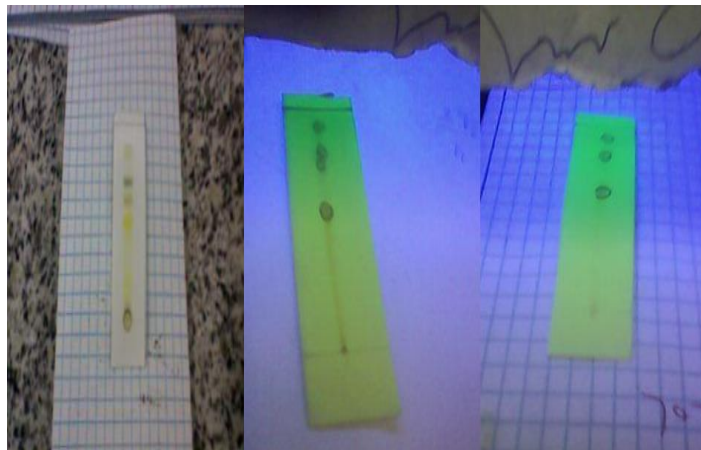
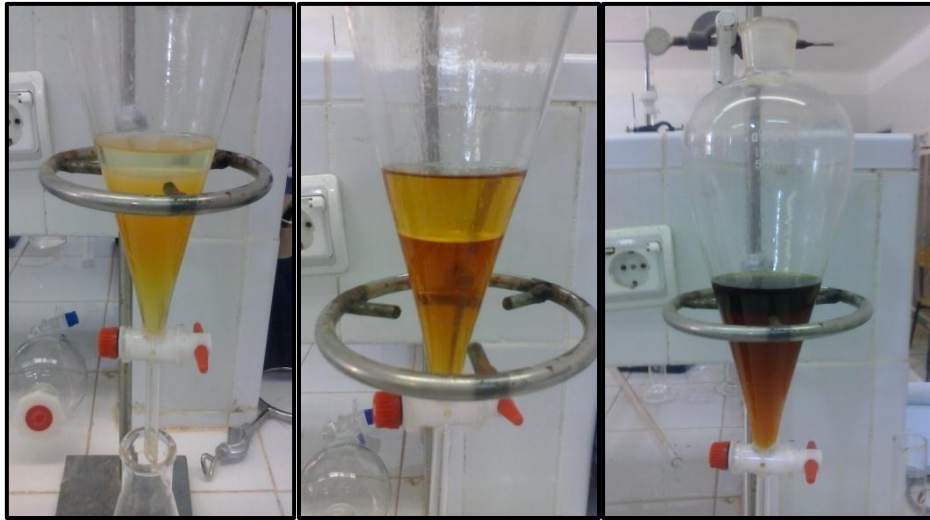
- the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* 28(10), 895-906.
- [86] Cuyckens et Claeys, 2004] Cuyckens F., and Claeys M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39(4), 1-15.  
Cuyckens F., and Claeys M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39(4), 1-15.
- [87] A. Lhuillier, N. Fabre, F. Moyano, N. Martins, C. Claparols, I. Fourasté and C. Moullis (2007) Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. In Press, doi:10.1016/j.chroma.2007.03.038
- [88] P. Ozenda " Flore du sahara septentrional et central". (1958). p 363 – 365.
- [89] L. Trabut " Flore du nord de l’Afrique". (1935). p 727 – 730 – 734.
- [90] P. Quezel et S. Santa " Nouvelle Flore de l’Algérie et des régions désertique miridionales ". Tome 1 Paris. (1962). p 187 – 188.
- [91] Henry N. Le HoueH rou " Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara ". *Journal of Arid Environments* (2001) 48: 103–128
- [92] Wagner Vilegas, Janete H. Y. Vilegas, Markus Dachtler, Tobias Glaser and Klaus Albert" Application of On-line C30 RP-HPLC-NMR for the Analysis of Flavonoids from Leaf Extract of *Maytenus aquifolium* ". *Phytochem. Anal.* 11, 317–321 (2000)
- [93] Hideyuki Ito, Eisei Nishitani, Takao Konoshima, Midori Takasaki, Mutsuo Kozuka, Takashi Yoshida." Flavonoid and benzophenone glycosides from *Coleogyne ramosissima* ". *Phytochemistry* 54 (2000) 695-700

## Extraction liquide/liquide avec les résultats de CCM

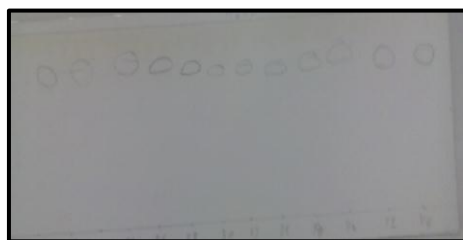
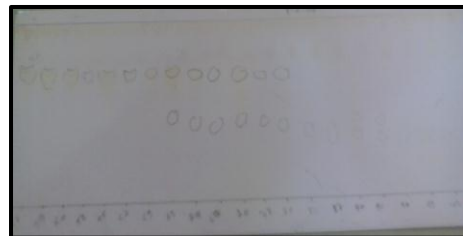
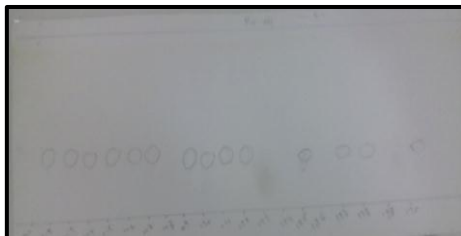
Ether diéthylique

acétate d'éthyle

butanol

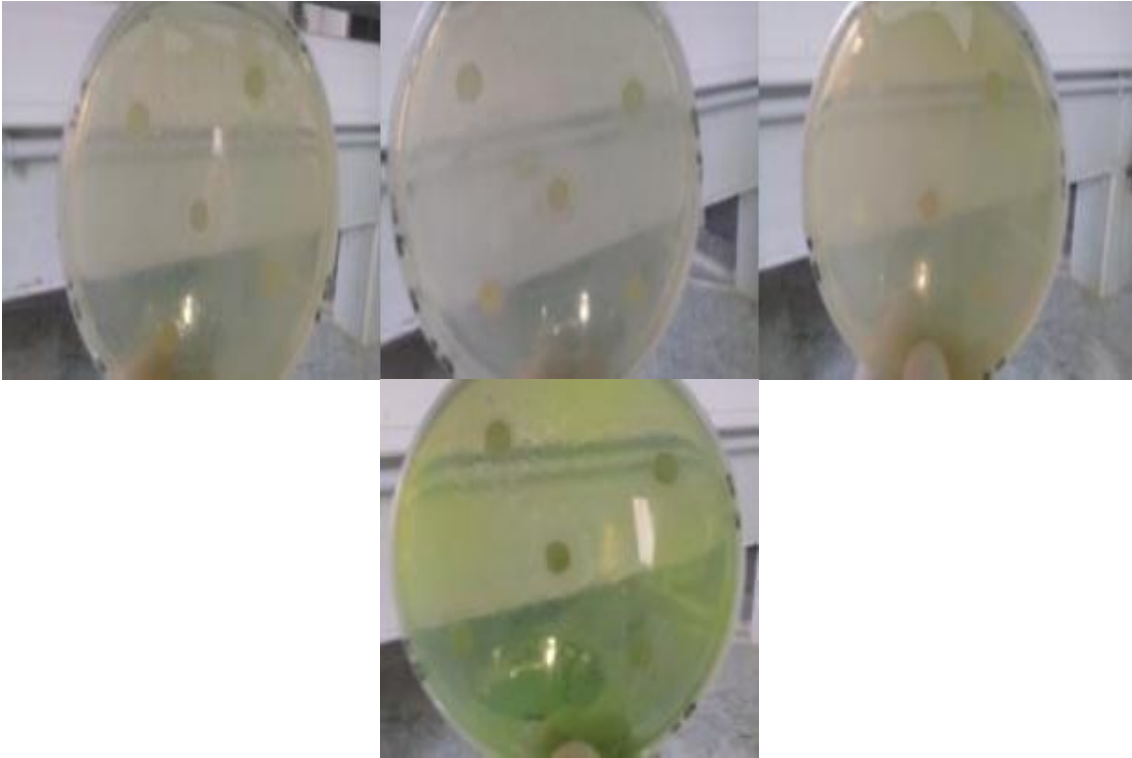


## Résultats de CCM après la séparation par chromatographie sur Colonne

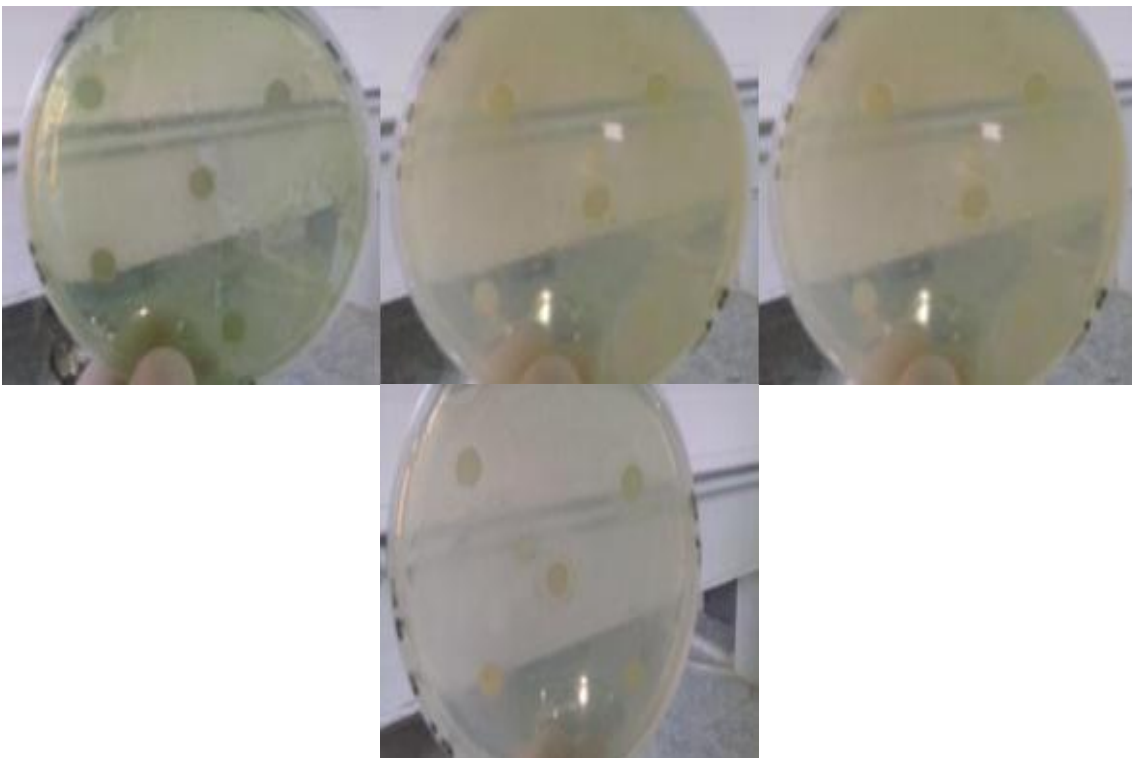


## Résultats d'activité antimicrobienne

### 1-Pour l'extrait methanolique

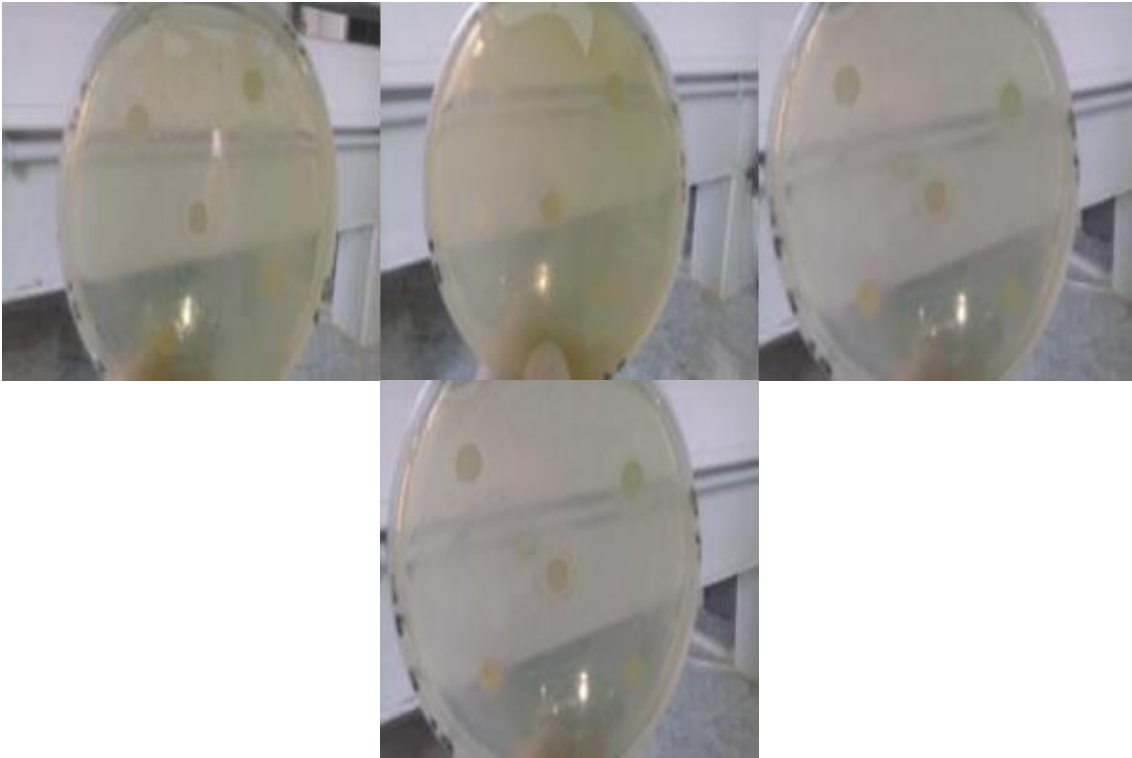


### 2-Pour l'extrait d'éther d'éthylque

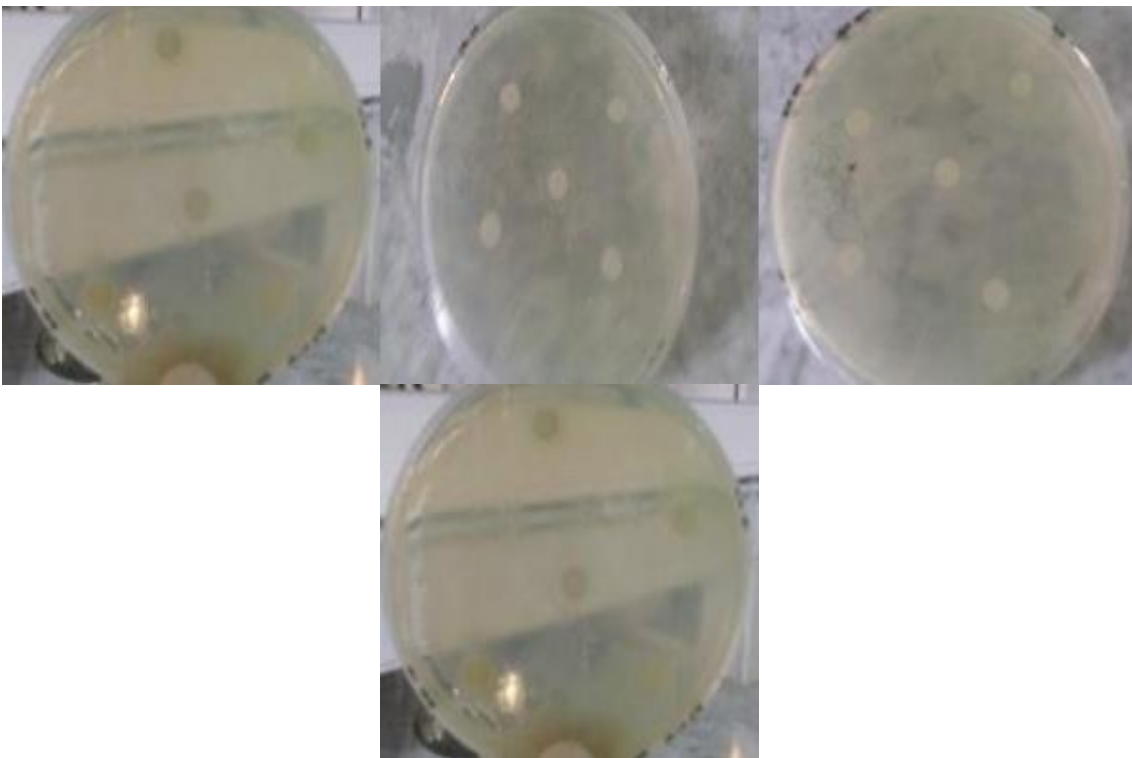




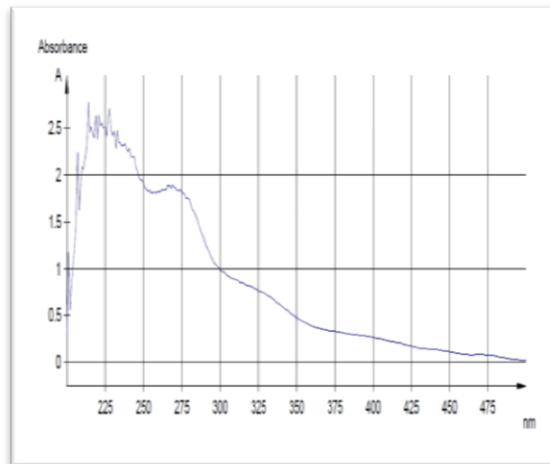
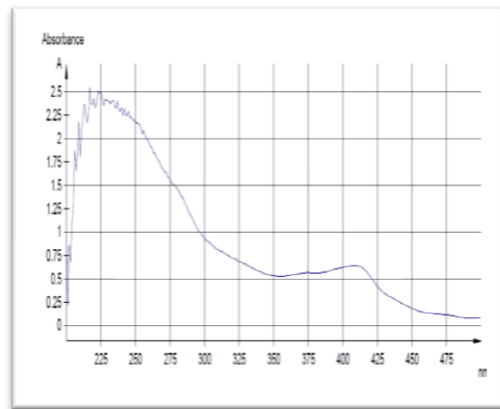
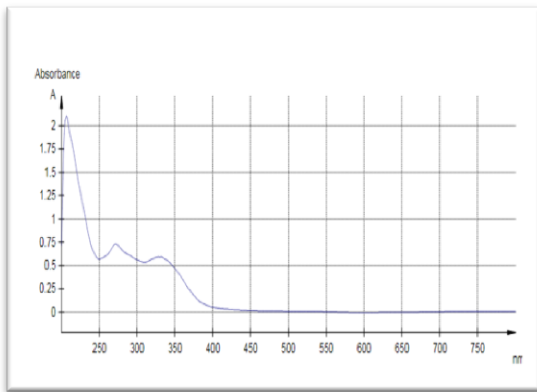
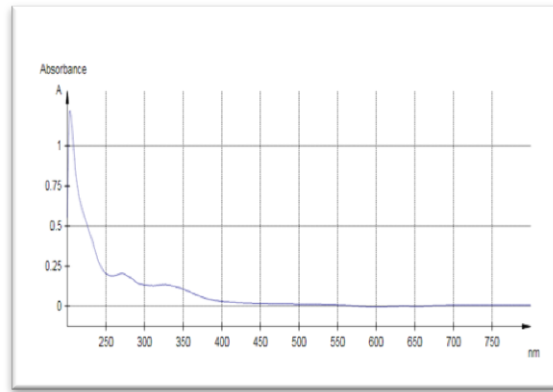
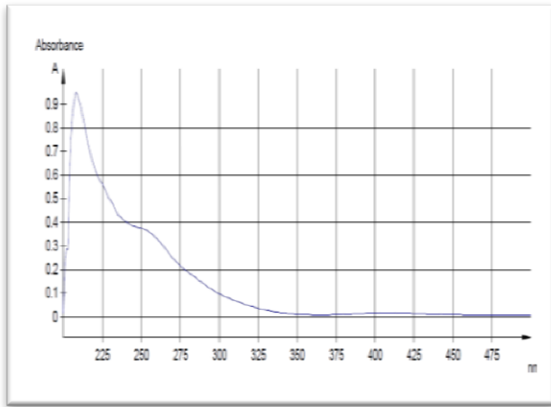
### 3-Pour l'extrait d'acétate d'éthyle



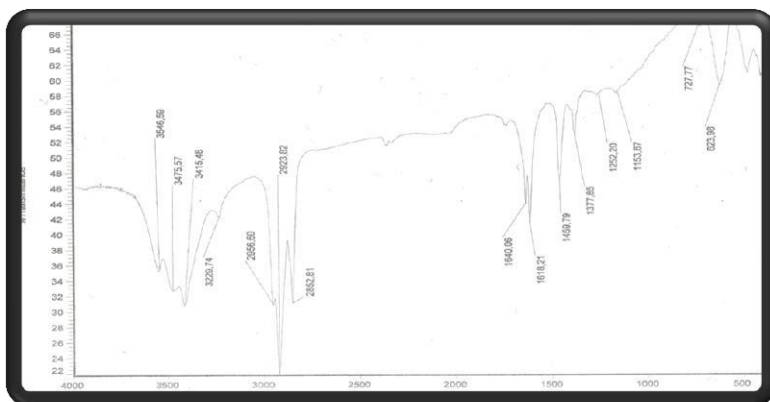
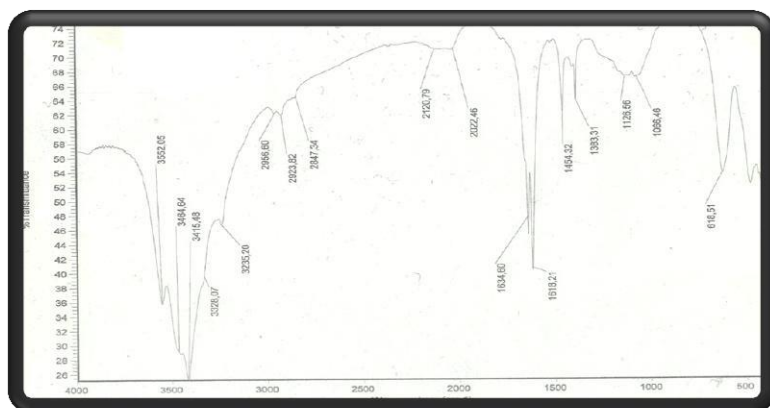
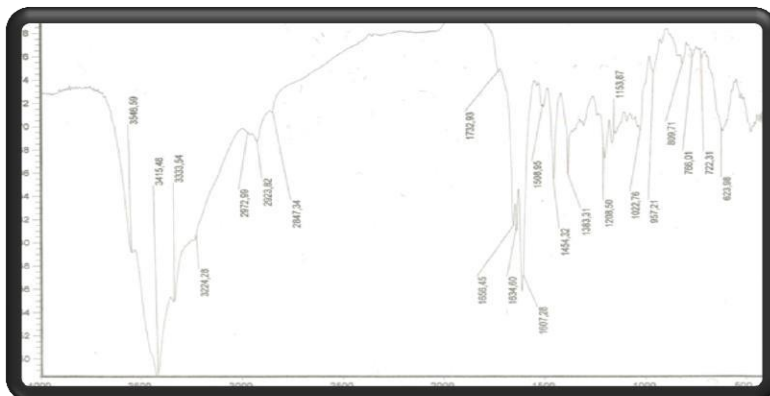
### 4-Pour l'extrait butanolique

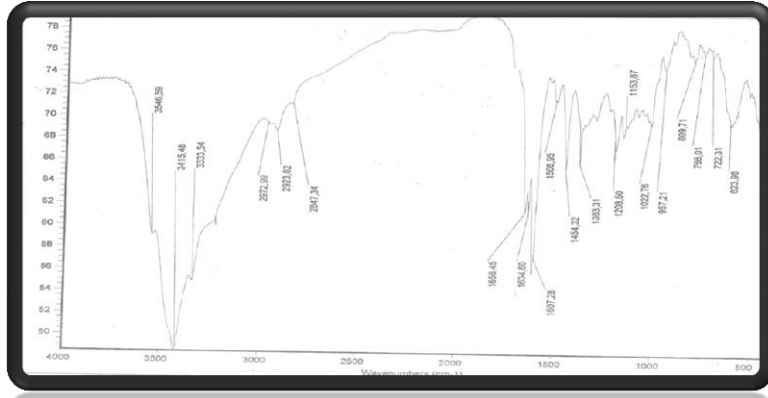


## Spectres d'ultra-violet et infra-rouge des composés séparés



# Spectres infra-rouge des composés séparés





## ETHNOPHARMACOLOGY AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF BIOACTIVE EXTRACTS OF *LIMONIASTRUM FEEI* (PLOMBAGENACEAE)

L. Ziane<sup>1</sup>, H. A. Lazouni<sup>2</sup>, A. Moussaoui<sup>3</sup>, N. Hamidi<sup>4</sup>

<sup>1,4</sup>Chemistry Laboratory, University of Bechar,

<sup>2</sup>Natural Product Laboratories, University Abou Bakr Belkaid, Imma Tlemcen,

<sup>3</sup>Laboratory of Valorization of Vegetal Resource and Food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, University of Bechar, ALGERIA.

<sup>1</sup> l.ziane@yahoo.fr

### ABSTRACT

*Limoniastrum feei* (plombagenaceae) is a plant traditionally used to treat gastric infection in the southeast of algeria (saoura region of bechar) northern Africa. [1-2]

Leaves, stem and twig of this plant were screened for the principal classes of secondary metabolites, such as anthraquinones, terpenes, saponins, alkaloids, coumarins, flavonoids and tannins.

**Keywords:** Limoniastrum feei, Bioactive extract, Phytochemical screening.

### INTRODUCTION

Present and future of medicinal plants, both as potential antimicrobial crude drugs as well as source for naturel compounds that act as new antimicrobial agents. It is interesting to note that local people believe that the medical effects of wild plants are better than those of cultivated species.

The aim of this studies is to evaluate the bioactives extracts of *Limoniastrum feei* plant of the Southeast of Algeria ( saoura region of Bechar ) northern Africa [1-2]by phytochemical screening. In earlier work we have reported the antimicrobial activity of aerial part crude extracts from *Limoniastrum feei* (Belboukhari et al 2005). In continuation of our studies on medicinal plants, we isolate tow flavonoids from methanolic extract of *Limoniastrum feei*. [3-4]

### PLANT MATERIALS AND EXTRACTION

Aerial parts of *Limoniastrum feei* were collected in March – May 2005 from Boukais (region in Bechar) south-western Algeria. A voucher spercimen (CA99/14) (Belboukhari et al 2005) is deposited at the herbarium of phytochemistry and organic laboratory of university of Bechar .

All parts of *limoniastrum feei* (leaves stem and twig) were individually ground to a fine powder .Extraction using soxhlet apparatus; reflux for 3 hours was performed. The residue was evaporated in vacuo apparatus, and according to the operative fashions of chemical screening one determines the present natural product in bioactive extract [5- 6].

### BOTANICAL DESCRIPTION

*Limoniastrum feei* is a tree belongs to *Plumbagenaceae* family. It grows to a height of 10 – 40 ft, it's possess long leaves and flowering palms without leaves, it's flower is entoured by a brickly bracts with a purplish red color. [2- 7]

*Limoniastrum feei* is common plant known under the name vernacular "Melefet Khadem" and used as a common herbal drug in the south-western Algeria (Ozenda, 1983, Cheriti et al 2004).



Figure 2. *Limoniastrum feei*

### Study Area

The district of Bechar (Saoura region of Bechar) is an area of 161400 km, it's situated between the high trays and the big sahara, in the SouthEast of Algeria Northern Africa. It's 1000 km far from the capital Algiers.

Climate is of the Sahara continental, it's whole dry, cold season starts from December to February and lasts May, June, July and August constitute a hot season it can reach the 40 °C. [8- 9]

### Population

The majority of the population consists of four important origins: dewimenâ, ouled djerir, cheraga and ksouri. A total population is 180115(1999). The language of the inhabitants is Arabic. The people's main source of living in this region is farming. [8- 10]

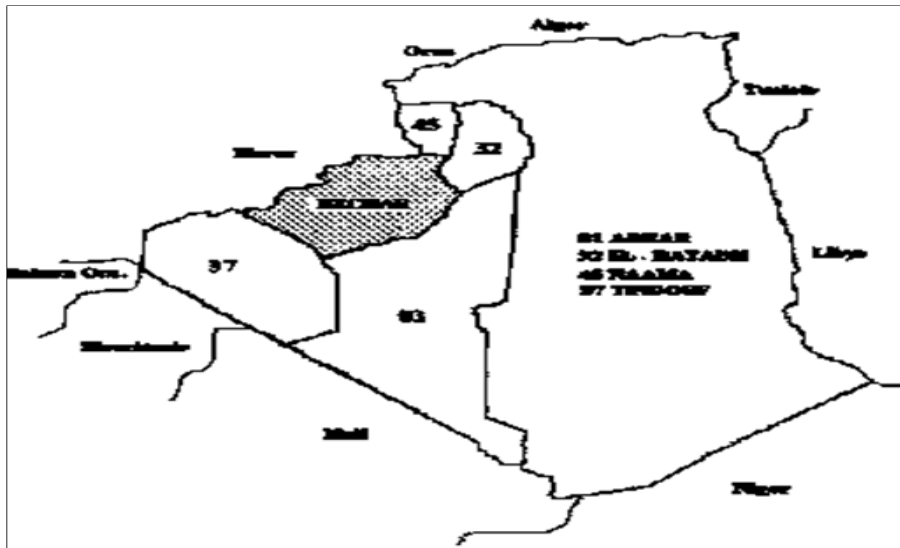


Figure 3. The location of Bechar district, Algeria

**Ethno pharmacology Screening**

According to the results of ethno pharmacology study to several medical plants that are used in Bechar (Southeast of Algeria) in traditional medicine, it carries out by laboratory LPSO (1998). We are interested to deepen the investigation of this specie.

**METHODOLOGY**

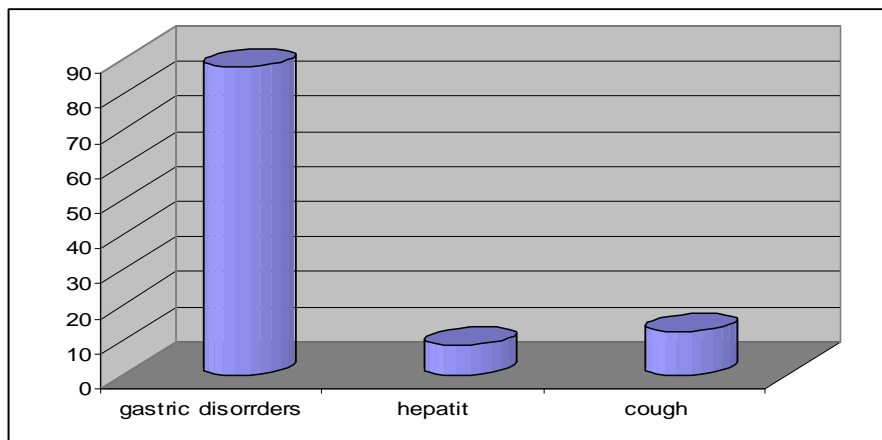
This ethno pharmacological investigation realized in the town of Bechar, during three months, failing to the pin inquiry, including one hundred persons.

Questionnaire include question on vernacular name, plant parts used, the plant part from (dried or fresh), medicinal use of plant medicinal preparation methods and the taken dose.

Gross-checked by interviewing elderly people aged between 50 and 70 years old, who had traditional knowledge about plants.

**RESULTS AND DISCUSSION**

Statistical information on the plant medicinal value authenticity used by the patients and elderly people is shown in the following histogram.



Preparations are usually made by using an entire plant parts.

The majority of medicinal traditional plants were prepared using water as solvent.

**Phytochemical Screening**

According to the results of biological screening of several extracts of three parts of *Limoniastrum feei* (leaves, stem and twig) [3- 4].The methanolic and heptan extracts of these parts of *Limoniastrum feei* were selected ( table1 ) and were carried out a phytochemical screening on the active extracts for this plants.

**Table 1. Extracts selected**

<i>Parts Use</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>pseudomonas aeruginosa</i>	<i>enterococcus faecalis</i>	<i>klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cereviceae</i>
<i>Leaves</i>	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
<i>Twig</i>	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
<i>Stem</i>	MeOH	MeOH	/	Heptan	MeOH	Heptan	/

The crude of metenolic and heptane extracts of three parts of *Limoniastrum feei* were screened for the presence of saponins, flavonoids, tannins.

**Table 2. Results of chemical screening of the aerial part of *Limoniastrum feei***

<i>Natural products</i>	<i>leaves</i>		<i>twig</i>		<i>stem</i>		
<i>Extracts</i>	MeOH	Water	MeOH	Water	MeOH	Water	Heptan
Alcaloïds	-	-	-	-	-	-	-
Saponins	+	+	+	+	+	+	+
Terpens	+	-	+	+	-	+	+
Tanins	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoïds	+	+	+	+	+	+	+
Free Flavonoïds	+	+	+	+	+	+	+
Heterosids flavonoïds	+	+	+	+	+	+	+
Steroids	+	-	-	-	-	-	+
cardenolids	-	-	+	-	+	-	+

+: existence, -: not detected

Qualitative phytochemical screening of the water; methanolic and heptane extract of three parts of *Limoniastrum feei* revealed the presence of saponins, tannins, Flavonoïds, free Flavonoïds and Heterosids flavonoïds. However, Alcaloïds were absent



## CONCLUSION

*Limoniastrum feei* (*plombagenaceae*) is a plant traditionally used to treat gastric disorders, prepared by decoction in water, took one cup of tea for each day. The phytochemical screening of the active extracts have noted the flavonoids, saponins and tannins existence in the methanolic, aqueous and heptane extracts of three parts the *Limoniastrum feei*. For that we have realized a correlation essay between the existing substances in plant extracts and both antibacterial and anti-fungal activity, which permit us to concluded that: the bioactive extracts contain Flavonoïds, saponins and tannins.

## REFERENCES

- [1] Cheriti, A. (2000). Rapport CRSTRA, plantes médicinales de la région de Bechar, sud ouest Algérie (Ethnopharmacological studies) Bechar, Algeria.
- [2] Ozenda, P. (1967). Flore du Sahara, Pat. : 270.
- [3] Belboukhari, N. & Cheriti, A. (2005). Antimicrobial activity of aerial part of *limoniastrum feei*. *Asian Journal of plant sciences*, 4(5), 496-498.
- [4] Belboukhari, N. & Cheriti, A. (2007). flavonoid of *limoniastrum feei*, *Research journal of phytochemistry*, 74-78.
- [5] King, B. Theodore Reginald Bott, Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents, Edt Springer.
- [6] Jan Rydberg, Solvent Extraction Principles and Practice, Edt CRC Press.
- [7] Maire, R. (1953). Flore de L'Afrique du Nord: (Maroc, Igerie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrenaïque et Sahara) (5 v.), Paris: Paul Lechevallier.
- [8] Belboukhari, N. (2002). Communication, 6<sup>ieme</sup> Congrès de la S.A.Chem, University Ferhat Abbass Setif, 14-16.
- [9] Belboukhari, N., Cheriti, A. & Hacini, S. (2002). Communication, 5<sup>ieme</sup> SNCOIP, S.A.Chem, 22- 23.
- [10] Cheriti, A., Belboukhari, N. & Hacini, S (2005). CO, Séminaire international sur la valorisation des plantes médicinales dans les zones arides, Ouargla 01-03 fevrier, Algeria; p-12. Nd.

FLAVONOID FROM METHANOLIC EXTRACT OF *LIMONIASTRUM FEEI* (GIRARD) BATT  
(*PLUMBAGINACEAE*)ZIANE L<sup>1\*</sup>, LAZOUNI HA<sup>2</sup>, MOUSSAOUI A<sup>3</sup>, HAMIDI N<sup>1</sup>, DJELLOULI M<sup>1</sup>, BELABBES A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Laboratory, University of Bechar, Béchar, Algeria. <sup>2</sup>Natural Product Laboratory, University Abou Bakr Belkaid, Imma Tlemcen, Algeria. <sup>3</sup>Laboratory of Valorization of Vegetal Resource and Food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, University of Bechar, Béchar, Algeria. Email: lziane@yahoo.fr

Received: 01 December 2014, Revised and Accepted: 29 December 2014

## ABSTRACT

According to the biological screening results of several extracts from three parts (leaves, stems and twigs) of *Limoniastrum feei* (*plumbaginaceae*) against fungi (*Candida albican*, *sacharomyce*), and bacteria (*Escherechia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebseilla enterococcus*) realized by disc diffusion method, we interested to isolate the natural products responsible of these activities. Our investigation led to the isolation of three phytochemical constituents by the liquid chromatography method, the compounds were identified by spectroscopic analysis as flavonoids. The isolated compounds were identified as Quercetin 1, kaempferol-3-o- $\beta$ -d-glucopyranoside (astragalin) 2 and quercetin-7-o- $\beta$ -d-glucopyranoside 3. The presence of different types of bioactive constituents in the *L. feei* extract may explain its wide use by the local population.

**Keywords:** *Limoniastrum feei*, Bioactive extract, Phytochemical screening, Flavonoid.

## INTRODUCTION

The search for drugs derived from plants has accelerated in recent years. Ethnopharmacologists, botanists, microbiologists, and natural-products chemists are raking the earth for new phytoconstituents, which could be used for the treatment of infectious diseases. It is interesting to note that local people believe that the medical effects of wild plants are better than those of cultivated species [1].

South Algeria with its rich floral resources and ethnobotanical history is an ideal place to screen plants for biological activity and as a source of new pharmacological compounds [2].

Plumbaginaceae is a cosmopolitan family, which includes 836 species grouped in 27 genera, including *Limoniastrum feei* (*Plombagenaceae*) which is a plant traditionally used to treat gastric disorders, prepared by decoction in water, and taking a cup of tea per day. The phytochemical screening of the active extracts has noted the presence of flavonoids, saponins and tannins in the methanolic, aqueous and heptane extracts of the three parts of the plant. For that we have realized a correlation essay between the existing substances in plant extracts and both antibacterial and anti-fungal activity, which permit us to conclude that: The bioactive extracts contain flavonoïds, saponins and tannins [1].

The purpose of this study was to isolate the components of the methanol extract of the leaves and stems of *L. feei*, we concluded that the crude extract has good antimicrobial activity [3-5].

## METHODS

## General experimental procedure

Ultraviolet (UV) spectra were obtained in MeOH solvent with Unicam UV300 spectrophotometer. Infrared (IR) spectra were obtained with an AVATAR 320 Fourier transform-IR spectrophotometer. The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were taken on a Bruker GP 250 (1H, 300 MHz; 13C, 75 MHz) spectrometer. Thin layer chromatography was carried out on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Column chromatography was performed over silica gel 60 (Merck, particle size 230-400 mesh).

## Plant materials

The whole plant was collected in March 2012 from Kenadsa (region of Bechar) Algeria, and identified by the National Agency of Nature

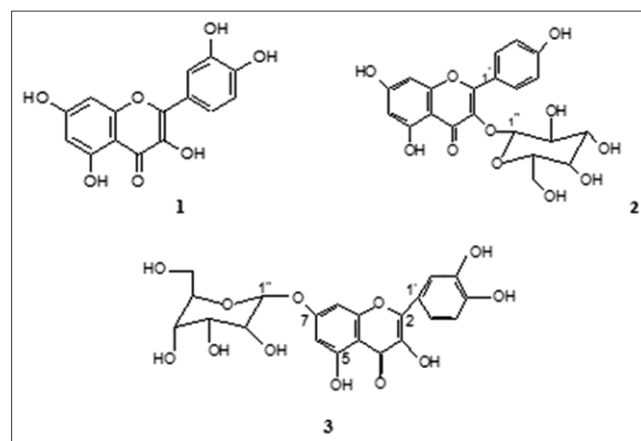
Protection (ANN), Bechar, Algeria. The leaves, stems and twigs were separated and dried. Stems and leaves were ground into powder form using the grinder [1,6,7].

## Extraction and isolation

The dried leaves (100 g) of *L. feei* were extracted with 80% MeOH (400 ml) using a soxhlet apparatus; reflux for 4 hrs was performed. The residue was evaporated in a vacuum apparatus, according to the procedures of chemical screening, to determine the presence of natural products in the bioactive extract [8]. That residue was then dissolved in 100 ml of distilled water and gave a brown aqueous solution. This aqueous residue was then partitioned sequentially with ethyl ether, ethyl acetate and n-butanol [9-11]. Both compounds were identified, and they are getting in the ethyl acetate fraction. To purify and identify the components of the ethyl acetate fraction (1.4 g), separations were achieved by liquid vacuum chromatography using four solvents of decreasing polarities (hexane, ethyl acetate, acetone, MeOH) and second column chromatography, using a column type class: 20 mm/300 mm (29/39) complete with a stationary phase of silica gel (0.20 mm) and the mobile phase chosen for this separation was: Acetone/toluene/formic acid. (60:80:10) [12,13].

## RESULTS AND DISCUSSION

After several separations and chromatographic analysis, the results were regrouped (Table 1).



**Table 1: Chromatographic features of phenolic fractions of leaves**

Physical sample	Aspect weight (g)	Column chromatography			
		Compounds	Weight (g)	Yield (%)	Rf
Orange solid	1.4	Fr-1	0.19	10.88	0.71
		Fr-2	0.59	39.33	0.61
		Fr-3	0.35	25.11	0.49

Quercetin 1: Tf=189°C, Rf=0.71 (acetone/toluene/formic acid, 6:8:1 with blue fluorescence at 365 nm), MW=302.23, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, 59.60% (C), 3.31% (H), 37.08% (O), UVmax spectra: λ=262, 270, et 350 nm, IR (KBr) ν<sub>max</sub>: 3546, 3415, 3333, 3224 (OH), 3102 (CH), 1656, 1634 (C=O α, β unsaturated), 1607, 1508 (C=C), 1153, 1022 (C-O-C). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 6.20 (1H, d, J=2.1 Hz, H-6), 6.40 (1H, d, J=2.1 Hz, H-8), 7.66 (1H, d, J=2Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, J=8.4Hz, H-5'), 7.50 (dd, J=8.4, 2Hz, H-6').

<sup>13</sup>C NRM: 154.5 (C-2), 128.11 (C-3), 187.48 (C-4), 162.16 (C-5), 97.6 (C-6), 167.21 (C-7), 97 (C-8), 154.33 (C-9), 109 (C-10), 131.34 (C-1'), 110.47 (C-2'), 142.18 (C-3'), 134.15 (C-4'), 118 (C-5'), 129.13 (C-6'). ESI-MS/MS m/z: 302 137 149 153 165.

Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (astragaline) 2: Tf=214°C, Rf=0.61, MW=448.21, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>, 54.40% (C), 4.31% (H), 41.50% (O), UV max (MeOH): 246, 270, 360. IR (KBr): 3 415, 3 229, 2 956, 2 852, 1 640, 1 454, 1 377, 1 263, 1 093/cm.

<sup>1</sup>H NMR: 6.31 (H-6), 6.50 (H-8), 7.34 (H-2', H-6', m), 6.98 (H-3', H-5', d), 5.27 (H-1''), 3.39 (H-2''), 3.21 (H-3''), 3.16 (H-4, m), 4.06 (H-5'', m), 3.75 (H-6''a, m), 4.34 (H-6''b).

<sup>13</sup>CNMR: 159.78 (C-2), 151.36 (C-3), 180.46 (C-4), 163.89 (C-5), 99.65(C 6), 166.50 (C-7), 95.51 (C-8), 158.27 (C-9), 110.15 (C-10), 123.11 (C-1'), 135.25 (C-2', C-6'), 122.70 (C-3', C-5'), 147.37 (C-4'), 106.12 (C-1''), 75.14 (C-2''), 78.10 (C-3''), 73.52 (C-4''), 79.02 (C-5''), 62.89 (C-6'').

Quercetin-7-O-β-D-glucopyranoside 3: Tf=271°C, Rf=0.49, MW=463.16, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>: 463.20, 56.25% (C), 4.46% (H), 39.28% (O), UV max (MeOH): 250, 276, 360. IR (KBr): 3 315, 2 913, 1 656, 1 508, 1 483, 1 308, 1 153, 1 022/cm

<sup>1</sup>H NMR: 5.42 (H-2, dd, J=12.2; 2.9Hz), 6.41 (H-3), 6.19 (H-6), 6.58 (H 8), 7.26 (H-2',m), 6.94 (H-5', d, J=8.4 Hz), 7.35 (H-6', d, J=8.4 Hz), 5.37 (H 1''), 3.27 (H-2''), 3.35 (H-3'', m), 3.20 (H-4), 3.73 (H-5'', m), 3.45 (H-6''a), 4.98 (H-6''b, m).

<sup>13</sup>CNMR: 157.88 (C-2), 106.36 (C-3), 171.46 (C-4), 156.19 (C-5), 99.35 (C-6), 169.10 (C-7), 96.50 (C-8), 153.17 (C-9), 107.55 (C-10), 129.10 (C-1'), 110.45 (C-2'), 132.70 (C-3'), 152.17 (C-4'), 115.32 (C-5'), 121.30 (C-6'), 104.52 (C-1''), 74.44 (C-2''), 75.10 (C-3''), 73.82 (C-4''), 76.32 (C 5''), 63.60 (C-6'').

The <sup>1</sup>H NMR data of compound 1 show two signals in the form of two doublets with coupling J<sub>4</sub> assigned to protons H-6 and H-8, and the aromatic protons at positions H-2', H-5' and H-6' which appear to the area without armor, with the chemical shifts: 7.66, 6.85, 7.50 ppm, respectively. After analyzing the results of the spectroscopic analysis (UV, IR and NMR), the compound 1 was identified as: Quercetin.

The UV spectrum of astragaline 2 showed characteristic flavonol absorptions at 270 and 360 nm. UV analysis using the shift reagent and AlCl<sub>3</sub> indicates the 5-hydroxy position is free. The absence of a band, I shift with NaOAc suggests that the hydroxyl group at C-7 is substituted. A bathochromic shift of the band I with sodium methoxide suggested that there was free 4'-hydroxyl group on the ring B [14].

In the infrared spectra, the bands matched to (3229-3415/cm) corresponding to the stretching vibration of the OH, vibration

frequencies located at (1640/cm) corresponding to the valence vibrations of C=O, α, β unsaturated.

The <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 2 showed two meta-coupled protons J<sup>4</sup> at δ<sub>H</sub> 6.31 and 6.50 which were assigned to H-6 and H-8, respectively.

The B ring moiety was oxygenated only at C-4' because of the two doublets at 6.98 and 7.34 assigned to H-3', H-5' and H-2', H-6', respectively.

In UV spectra analysis of compound 3, the addition of AlCl<sub>3</sub> reagent leads a bathochrom displacement of band I (+400 nm) in UV spectrum, what shows the presence of a hydroxyl group in position 5 (P. Waridel 2003), in relation to this spectrum, the addition of AlCl<sub>3</sub> solution in acid medium shows other bathochrom displacement of the band I (+400 nm), which indicates the presence of two groups ortho-hydroxyls in the B part of the genine flavonol [15]. Its IR spectrum showed a broad band at 3415/cm typical of a hydroxyl group chelated to a conjugated carbonyl group at 1656/cm.

The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the compound 3 presents two other more unarmored signals, as two doublet, with a J<sup>3</sup> and J<sup>4</sup> coupling assigned to the aromatic protons H-2' at δ<sub>H</sub> 7.26 ppm and H-6' at δ<sub>H</sub> 7.34 ppm, the proton H-5' rezoned in a doublet toward 6.94 ppm, and two signals appears toward 6.19 and 6.58, corresponding to protons H-6 and H-8, respectively.

## REFERENCES

- Ziane L, Hamidi N, Lazouni HA, Moussaoui A. Ethnopharmacology and phytochemical screening of bioactive extracts of *Limoniastrum Feei* (plombagenaceae). Asian J Nat Appl Sci 2013;2(2):5-9.
- Hamidi N, Lazouni HA, Moussaoui A, Ziane L, Saad A. GC-MS analysis of ethanol extract from the aerial parts of *Fagonia Longispina* (family Zygophyllaceae). Asian J Nat Appl Sci 2012;1(2):136-42.
- Ozenda P. Flore du Sahara. 2<sup>nd</sup> ed. Paris: CNRS; 1983.
- Ziane L, Hamidi N, Belabbesse A, Krim A. Ethnopharmacology and phytochemical screening of bioactive extracts of *Limoniastrum feei*, Troisieme Colloque International de Chimie, Batna, Algérie; 2011.
- Hamidi N, Lazouni HA, Moussaoui A, Ziane L, Djellouli M, Belabbesse A. Ethnopharmacology, antibacterial and antioxidant activities, phytochemical screening of bioactive extracts from the aerial parts of *Fagonia longispina*. Asian J Nat Appl Sci 2014;3(3):53-63.
- Maire R. Flore de L'Afrique du Nord: Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrenaïque et Sahara. Paris: Paul Lechevallier; 1953.
- Schauenberg P, Paris F. Guide des Plantes Médicinales. Paris: Delachaux et Niestlé; 1977.
- King B, editor. Theodore Reginald Bott, Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents. Netherlands: Springer; 1993.
- Desmond S, Daneel F, Jannie P, Marais J. (2005) Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. Phytochemistry 66, 2177-2215 (1991).
- Hostettman K, Marston A, Hostettmann M. Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 1998.
- Hamburger MO, Cordell GA. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. J Nat Prod 1987;50(1):19-22.
- Hamidi N, Ziane L, Belabbesse A. Chemical Constituents of *Anabasis Aretoides*. Troisieme Colloque International de Chimie, Batna, Algérie; 2011.
- Ziane L, Hamidi N, Belabbesse A, Krim A. Phytochemical Screening of Bioactive Extracts of *Limoniastrum feei*, International Congress on Aromatic and Medicinal Plants CIPAM2012, Sidi Bel-Abbes, Algérie; 2012.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas HB. The Systematic Identification of Flavonoids. Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1970.
- Bacon JD, Mabry TJ. UV spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. Rev Latinoam Quimica 1976;7:83-6.