

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE
PRESENTE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE MASTER
EN CHIMIE

SPECIALITE
CHIMIE DES PRODUITS NATURELS
Par

Dallel SERIR et Khaoula BOUINEM

**Isolement et détermination structurale des métabolites
secondaires de type flavonique de l'espèce *Limonium
pruinsum*-Etude de la phase n-butanol**

SOUTENU LE : 17 / 09 / 2019

Devant le jury :

| | | |
|-------------------------|----------------------------|------------|
| Mme TOUAFEK Ouassila | MCA.Université Saad Dahleb | Présidente |
| Mme KENNOUCHE Samira | MCB.Université Saad Dahleb | Promotrice |
| Mr MEZRAG Abd Al rahman | MCB.Université Saad Dahleb | Examineur |

Je dédie ce travail

A ma Mère

A la mémoire de mon Père et Oncle

A mes Sœurs

Et A mon Frère

A toute ma famille

A tous mes amis

Merci à tous...

DALLEL

Je dédie ce travail

À mes chers Parents

À mes Amis

À toute ma Famille

Khaoula.

Remerciements

Avant tout, nous remercions DIEU, sans Lui ce manuscrit n'aurait pu exister.

Nous tenons à remercier vivement notre encadreur, Madame Kennouche Samira Doctor à l'Université SAAD DAHLEB-Blida, pour avoir dirigé ce travail depuis le début, pour sa grande disponibilité, ses judicieux conseils, pour son soutien et sa grande générosité, et tout le temps consacré à notre relecture, et nous espérons qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude.

Nous adressons également nos remerciements à Madame Touafek Ouassila Doctor à l'Université SAAD DAHLEB-Blida 1, pour avoir acceptée d'examiner ce mémoire et c'est un grand honneur pour nous.

Nous remercions sincèrement Monsieur Mezrag Abd al rahman Doctor à l'Université SAAD DAHLEB-Blida pour tout ce qu'il nous a appris durant le travail dans laboratoire, pour son aide, ses conseils et sa gentillesse aussi pour avoir accepté de juger ce travail. Nous tenons à lui exprimer notre gratitude et notre grand respect.

Nous exprimons nos vifs remerciements à tous les employeurs de laboratoire de Département de Chimie pour leurs aides.

Nous remercions également, toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RESUME

Notre but dans ce travail consiste à la détermination des composés flavonoïdes contenus dans la phase n-butanol de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de l'espèce *Limonium pruinsum*.L (plombagénacea).

Après macération de la matière végétale dans une solution éthanol-eau (9:1 v:v), filtration et concentration, la solution obtenue est diluée avec de l'eau distillée et subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante : dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol. La phase n-BuOH est soumise à la séparation et à la purification par diverses méthodes chromatographiques (colonne, couche mince) conduisant à l'isolement et à la purification d'un composé pur qui est :

✓ 3, 5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone

La structure de ce composé a été bien établie par les méthodes spectroscopiques (Visible-Ultraviolet , Résonance Magnétique Nucléaire-¹H).

Ainsi ,On a isoler un autre composé de type flavonol substitué en position 3, dont la structure n'est pas encore déterminée .

Mots clés :

Plumbaginaceae, *Limonium pruinsum* , phytochimique polyphénols, flavonoïdes.

ABSTRACT

The aim of this work consists in the determination of flavonic compounds contained in the *n*-butanol phase of the hydroethanolic extract of the aerial parts of the species *Limonium pruinosm*.L (plombagénacea).

After maceration of the vegetable matter in an EtOH-H₂O solution (9:1 v:v), filtration and concentration. The solution obtained is diluted with distilled water and undergoes successive washes with solvents of increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The *n*-BuOH phase is subjected to separation and purification by various chromatographic methods (column, TLC) leading to the isolation and purification of a pure compound which is:

✓ **3, 5,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone**

The structure of this compound has been well established by spectroscopic methods (Ultraviolet-visible, Nuclear Magnetic Resonance -¹H).

Thus, another compound of flavonol type substituted in position 3 has isolated, whose structure is not yet determined.

Key words:

Plumbaginaceae, *Limonium pruinosum*, phytochemical, polyphenols, flavonoids.

الملخص

هدفنا في هذا العمل هو تحديد المركبات الفلافونية الموجودة في طور n- البيوتانول من المستخلص الهيدروإيثانول

في الأجزاء الهوائية من النبتة (*Limonium pruinosum*.L (plombagenacea).

بعد تقليب المادة النباتية في محلول إيثانول-ماء (9:1 ح:ح) تتم عملية الترشيح والتركيز. يتم تخفيف المحلول الناتج بإضافة الماء المقطر له و بعدها يخضع لاستخلاصات متتالية عن طريق مذيبات ذات قطبية متزايدة: ثنائي كلورو الميثان ، أسيتات إيثيل و ن- بيوتانول. يخضع طور ن- بيوتانول للفصل والتنقية بطرق كروماتوجرافيا مختلفة (عمود ، طبقة رقيقة) ، مما أدى الى عزل و تنقية مركب نقي و هو :

✓ 3, 5, 4- ثلاثي هيدروكسي- 7 , 3-ديميثوكسي فلافون

تم تحديد البنية الجزيئية لهذا المركب بشكل جيد بواسطة الطرق الطيفية (الرنين المغناطيسي النووي- بروتون، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية

كما تم عزل مركب اخر من نوع فلافونول مستبدل في الموضع 3، حيث لم يتم تحديد بنيته بعد.

كلمات مفتاحية :

الرصاصيات، *Limonium pruinosum*، الفيتوكيميائية ، البوليفينول ، الفلافونويد

Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

AcOEt : Acétate d'éthyle

BAW: *n*-butanol / Acide acétique/ Eau

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CHCl₃ : Chloroforme

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

COSY : Correlated Spectroscopy

13

C : Carbone

d : Doublet

dd : Doublet de doublet

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfert

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EtOH : Ethanol

Glu : Glucose

¹H : Proton

H₂O : Eau

J (Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz

m : Multiplet

m/z : Masse / Charge atomique

MeOH : Méthanol

MS : Spectrométrie de masse

ppm :Partie par million

R_f : Rapport frontal

RMN-¹H: Résonance magnétique nucléaire du proton

s : Singulet

t : Triplet

u.m.a : Unité de masse atomique

UV : Ultraviolet-visible

δ : Déplacement chimique (en ppm)

Table des matières

| | |
|---------------------------|---|
| <i>Introduction</i> | 1 |
|---------------------------|---|

Chapitre I : Synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| I.1.La famille des plombaginacées..... | 3 |
| I.1.1.Utilisation traditionnelle..... | 4 |
| I.2.Le genre <i>Limonium</i> Tourn | 5 |
| I.2.1.Etude pharmacologique du genre <i>Limonium</i> | 6 |
| I.3.L'espèce <i>Limonium pruinosum</i> | 6 |
| I-3-1-Classification botanique..... | 6 |
| I-3-2-Description de l'espèce..... | 7 |
| I-3-3-Répartition géographique..... | 8 |
| I-3-4-Dénomination et synonyme..... | 8 |
| I.4. Etudes chimiques antérieures..... | 9 |
| I.4.1. Les flavonoïdes..... | 9 |
| I.4.2.Divers | 12 |

Chapitre II :Les flavonoïdes

| | |
|--|----|
| II.1.Généralité | 14 |
| II.2.Structure..... | 14 |
| II.3. Classification des flavonoïdes | 15 |
| II 3.1.Flavones et flavonols | 15 |
| II.3.2.Flavanones et dihydroflavonols..... | 15 |
| II.3.3.Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols..... | 16 |
| II.3.4.Chalcones et aurones..... | 16 |
| II.3.5.Isoflavone..... | 17 |
| II.4.Substitution du squelette flavonique..... | 17 |
| II.4.1. L'hydroxylation..... | 17 |
| II.4.2. La méthylation ou méthylation..... | 18 |

| | |
|--|----|
| II.4.3. La O-glycosylation. | 18 |
| II.4.4. La C-glycosylation. | 18 |
| II.5. Activités biologiques des flavonoïdes. | 18 |
| II.5.1. Activité anti-oxydante. | 18 |
| II.5.2. Autres activités biologiques des flavonoïdes. | 19 |
| II.6. Etude chimique des flavonoïdes. | 19 |
| II.6.1. Extraction. | 19 |
| II.6.2. Méthodes de séparation et de purification. | 20 |
| II.6.2.a. La chromatographie sur couche mince. | 20 |
| II.6.2.b. La chromatographie sur couche mince préparative. | 20 |
| II.6.2.c. La chromatographie d'adsorption sur colonne | 20 |
| II.7. Analyse structurale des flavonoïdes. | 21 |
| II.7.1. Généralités. | 21 |
| II.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique. | 21 |
| II.7.3. La fluorescence sous lumière de Wood. | 22 |
| II.7.4. La spectrophotométrie UV-Visible. | 23 |
| II.7.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN- ¹ H) | 27 |

Chapitre III : Travail personnel

| | |
|--|----|
| III.1. Récolte et séchage de la matière végétale. | 29 |
| III.2. Le screening phytochimique. | 29 |
| III.2.1. L'extrait végétal hydro-alcoolique. | 29 |
| III.2.1.1. Le screening phytochimique des flavonoïdes. | 29 |
| III.2.1.1.1. Test de bate-smith (test de flavan3, 4diols) | 29 |
| III.2.1.1.2. Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones) | 29 |
| III.2.1.2. Le screening phytochimique des tannins. | 30 |
| III.2.2. L'extrait végétal étherique. | 30 |
| III.2.2.1. Le screening phytochimique des quinones. | 31 |

| | |
|---|----|
| III.2.2.2. Le screening phytochimique des coumarines | 31 |
| III.2.3.L'extrait végétal chloroformique | 31 |
| III.2.3.1. Le screening phytochimique des anthraquinones | 31 |
| III.2.4.L'extrait végétal de l'acide sulfurique. | 32 |
| III.2.4.1.Le screening phytochimique des alcaloïdes | 32 |
| III.2.5.Les saponosides. | 32 |
| III.3. Extraction du matériel végétal. | 32 |
| III.4.Dosage des phénols totaux. | 35 |
| III.4.1.Principe de la méthode. | 35 |
| III.5. Séparation chromatographique de l'extrait <i>n</i> -butanol.. . . . | 35 |
| III.5.1. Séparation chromatographique sur colonne. | 36 |
| III.5.2. Analyse chromatographique sur couche mince des fractions | 37 |
| III.5.3.Séparation et purification des fractions | 39 |
| III.5.3.1.Traitement de F2. | 39 |
| III.5.3.2.Traitement de F9. | 41 |

Chapitre VI : Interprétation des résultats

| | |
|--|----|
| IV.1.Les résultats du screening phytochimique | 45 |
| IV.2. Résultats de dosage des polyphénols. | 46 |
| IV.3.Identification de structure du composé F2. | 48 |
| IV.3.1.La spectrophotométrie UV. | 48 |
| IV.3.2.La spectrométrie RMN- ¹ H | 50 |
| IV.4. Identification de structure du composé F9. | 53 |
| Conclusion. | 54 |
| Références. | 55 |

Introduction

La phytochimie ou chimie des végétaux est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes [1].

Les substances isolées à partir des végétaux ont montré des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles [2].

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne [3].

Les flavonoïdes constituent l'un des principales classes des métabolites secondaires qui se localisent généralement au niveau de différentes parties de la plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, grains, bois...). Ces composés sont connus pour leurs propriétés biologiques très importantes et très vastes, nous pouvons dire que ce sont notamment de grands antioxydants et antimicrobiens [4]. L'Algérie dispose une grande biodiversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle.

Cette étude consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes de l'espèce *Limonium pruinosum* qui appartient à la famille des plombaginacées. Les diverses investigations phytochimiques menées sur le genre *Limonium* ont montré une richesse remarquable en composés phénoliques notamment les flavonoïdes [5,6].

Ce mémoire est subdivisé en quatre chapitres :

- ◆ Le premier chapitre décrit la présentation botanique de la famille des plombaginacées, du genre *Limonium*, et de l'espèce étudiée, ainsi expose les travaux antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants.
- ◆ Le deuxième chapitre montre l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes), les différents squelettes flavoniques, leurs diversités structurales et leurs intérêts thérapeutiques, reporte également les méthodes nécessaires à la

séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de substances naturelles.

- ◆ Le troisième chapitre englobe le travail personnel qui consiste en l'extraction, la séparation, la purification et l'étude chimique de l'espèce.
- ◆ Le quatrième chapitre est consacré à l'interprétation des résultats obtenus. Nous finirons le tout par une conclusion qui porte les résultats de notre travail.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La famille des Plombaginacées :

Les Plumbaginacées (ou Plombaginaceae) est une famille de plantes dicotylédones [7] qui comprend environ 700 espèces regroupées en 27 genres. Elles sont représentées en Algérie par 4 genres *Armería* Willd, *Plumbago* Tourn, *Limoniastrum* Moench, *Limonium* Tourn [8].

C'est une famille qui est acclimatée à toutes les régions de la planète, froides jusqu'à tropicales et on peut même les voir en zones salines, elle concerne des plantes herbacées, des arbustes et des lianes qui sont annuels ou vivaces [9].

Les caractéristiques communes à cette famille sont :

- ◆ Feuilles simples entières, parfois en rosettes [8] basales ou alternes [9] sur les tiges aériennes [10], dépourvues de stipules [11].
- ◆ Fruit sec est recouvert d'un calice indéhiscent que l'on nomme capsule et ne contenant qu'une seule graine [9].
- ◆ Inflorescence est réunie en cyme axillaire ou terminale [9].
- ◆ Fleur bisexuée [12], régulière, hermaphrodite, pentamère et tétracyclique, le périanthe est constitué de 5 sépales soudés entre eux, souvent persistants et de 5 pétales soudés, l'androcée est isostémone, avec 5 étamines opposées aux pétales, la pollinisation est entomophile, le gynécée possède 5 carpelles soudés, formant un ovaire uniloculaire et uniovulé, les carpelles sont surmontés par stigmates libres (*Plumbago*) ou même 5 styles libres (*Armeria*), l'ovule bitégumenté est anatrope [8].



Armeria marit



Plumbago europaea



L'arméria faux-plantain



Limonium narbonense

Figure I.1 : Quelques espèces des Plombaginacées

I-1-1-Utilisation traditionnelle :

De nombreuses espèces et genres des Plombaginacées ont fait partie de l'arsenal de la médecine traditionnelle de plusieurs populations mondiales, il est noté que l'espèce *Limoniastrum feei* (plante native de sud-Est Algérien) a généralement été utilisée afin de traiter la bronchite et les infections intestinale [13].

Dans le sud de la Tunisie, la tisane des feuilles, des branches et des galles de *Limoniastrum guyonianum* a été utilisée dans la médecine populaire comme un remède de la dysenterie [14].

En Chine l'espèce *Limonium sinense* est largement employée à des fins curatifs y compris : l'hémorroïde, la fièvre, l'hépatite, la diarrhée et la bronchite [15,16].

L'infusion des racines de *Limonium brasiliense* (espèce répartie en Argentine, Uruguay et dans le sud du Brésil) a été traditionnellement utilisée pour le traitement de l'hémorragie et de rhumatisme, ainsi que pour ses propriétés cardioprotectives [17].

Le genre *Plumbago* est originaire d'Afrique du Sud, comporte plusieurs espèces utilisées en médecine traditionnelle :

- ◆ *Plumbago europaea* (dentelaire) : Répandue sur tout le pourtour de la méditerranée. On l'employait pour soigner le cancer, la rache (teigne), les ulcères, hémorroïdes et aussi le mal de dents [18].
- ◆ *Plumbago zeylanica* est très apprécié dans toute l'Afrique et l'Asie en tant que remède contre les maladies de peau, les infections et les vers intestinaux, notamment la lèpre, la gale, la teigne, la dermatite, les plaies, les ulcères de la jambe et les hémorroïdes [19].
- ◆ *Plumbago auriculata* est une espèce très couramment proposée dans les jardinerie, elle est originaire d'Afrique du sud, la racine pressée de cette espèce peut colorer la peau en gris-bleu, elle est utilisée pour le tatouage [8].

I-2-Le genre *Limonium* Tourn :

Le genre *Limonium* Tourn fait partie de la famille des Plombaginacées a été souvent connu sous le synonyme *statica* [20].Le nom *Limonium* est dérivé du mot grec *Leimon*, signifiant pré. La plante pousse essentiellement près de la mer, dans les prés-salés. Pas étonnant que cette fleur est également connue sous le nom de lavande de mer [21].

Ce genre regroupe environ 400 espèces [22] qui sont réparties généralement dans différentes zones du monde notamment les zones tropicales ainsi que les zones tempérées tels que l'Europe, l'Afrique, l'Amérique latine, le Proche-Orient, le Japon et la Chine [20]. Dans la flore algérienne on récence environ 23 espèces [23] dont 8 sont endémiques .Les plantes du genre *Limonium* sont des plantes herbacées annuelles ou plus souvent vivaces, d'arbustes ou de plantes grimpantes, souvent rhizomateux .

Les *Limonium* se caractérisent par des feuilles persistantes ou caduques, quasiment sans pétiole, regroupées en rosettes.

Les fleurs ont un périanthe imbrique, dont les écailles sont placées les une sur les autres, la corolle est en forme d'entonnoir à leur base, mais large et étendu au sommet, la fleur a cinq étamines en forme d'alène, plus courtes que la corolle et dont les sommets sont tombants, avec un germe très menu, qui soutient cinq styles minces, éloignés et couronnés par des stigmates aigus, le calice de la fleur se resserre ensuite au cou par l'expansion du limbe, et renferme les semences [21]. La détermination des espèces du genre *Limonium* est rendue difficile par la forte variabilité qui s'observe chez de nombreuses espèces [24].



Limonium minotum



Limonium pectinatum



Limonium virgatum



Limonium lobatum



Limonium sinuatum

Figure I.2 : Quelques espèces du genre *Limonium*

I-2-1- Etude pharmacologique du genre *Limonium* :Tableau I.1: Les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Limonium*

| Espèce | Médecine traditionnelle | Propriété thérapeutique | Réf |
|--|--|--|----------------------|
| <i>Limonium wrightii</i> (Hance) Kuntze | La fièvre, l'arthrite | Antioxydante Hepatoprotective Cardioprotecteur | [25] [26] |
| <i>Limonium gmelinii</i> (Willd) Kuntze | Les maladies intestinales, les maladies des voies respiratoires | Antibactérienne Antifongique Anti leishmania Antiproliférative Anti-exsudative | [25] [27] |
| <i>Limonium axillare</i> (Forssk) Kuntze | Le diabète, les blessures, les inflammations, tamer | Anti inflammatoire Antitumorale | [28] [29] |
| <i>Limonium densiflorum</i> (Guss) Kuntze | | Antioxydante anti-inflammatoire anticancéreuse | [30] |
| <i>Limonium vulgare</i> P. Mill | La tuberculose, remède, hémorragie, la diarrhée, la dysenterie saignements, action astringente, la dysenterie | Cytotoxique Antitumorale | [31] [32] [33] |

I-3-L'espèce *Limonium pruinosum* Chaz :

I-3-1-Classification botanique : [34]

Règne : Plante

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Caryophyllidae

Ordre : Plumbaginales

Famille : Plumbaginaceae

Genre : *Limonium*Espèce : *Pruinosum*

I-3-2-Description de l'espèce :

Cette plante pousse sur les sols argileux des oueds à eau et sol salés .Les tiges sont vertes foncées, ramifiées ne portent pas de feuilles, leurs extrémités portent de très nombreux glomérules de petites fleurs roses. Les feuilles forment une éphémère rosette à la base des tiges [35].



a) La fleur



b) La tige



c) La plante entière

Figure I.3: *Limonium pruinosum*

I-3-3-Répartition géographique :

Cette espèce est largement distribuée en Algérie, en Maroc, en Tunisie en Libye, en Égypte, en Palestine et en Jordanie [34].

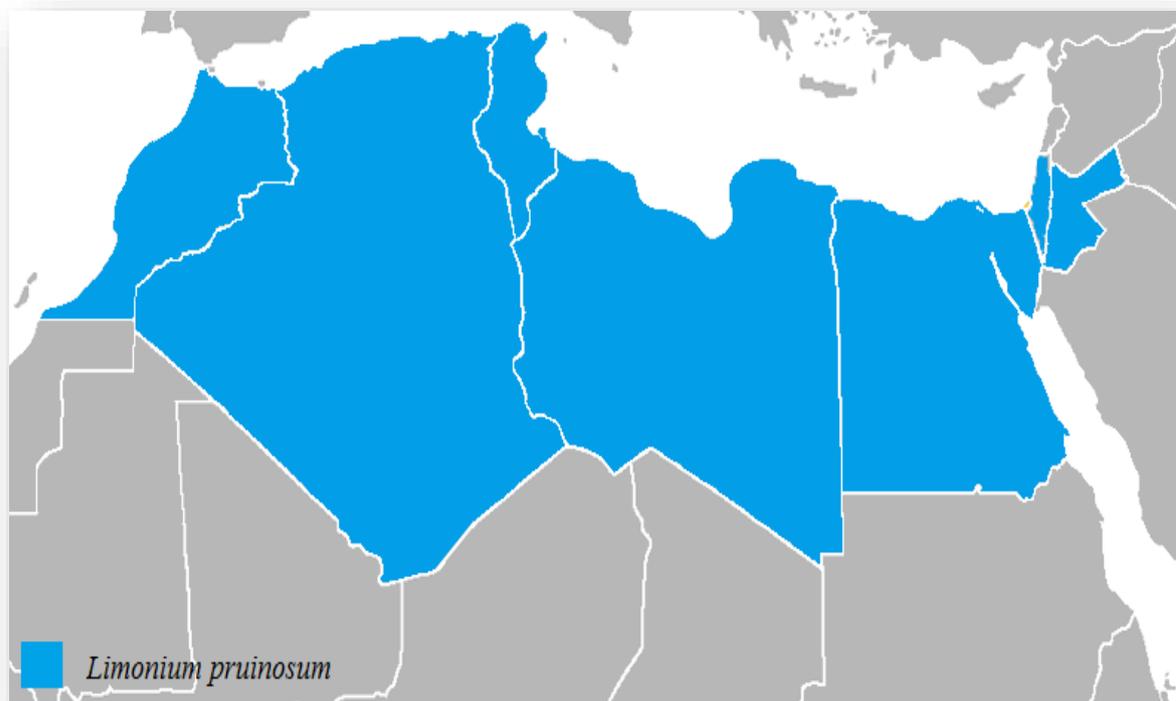


Figure I.4: Répartition géographique de *Limonium pruinosum*

I-3-4-Dénomination et synonyme :

Tableau I.2 : Les synonymes de l'espèce *Limonium pruinosum*

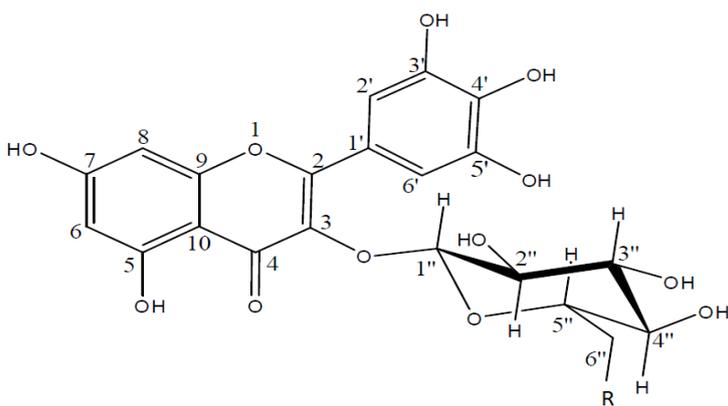
| Synonyme de l'espèce <i>Limonium pruinosum</i> (L) Chaz (1790) | |
|---|--|
| <i>Statice pruinosa</i> L. (1767) | <i>Limonium alleizettei</i> (Pau) Brullo & Erben (1989) |
| <i>Statice pruinosa</i> var. <i>hirtiflora</i> Cavara | <i>Statice alleizettei</i> Pau (1929) |
| <i>Limonium pruinosum</i> var. <i>hirtiflorum</i> (Cavara) Maire & Weiller (1939) | <i>Limonium pruinosum</i> var. <i>glabrum</i> Maire & Weiller (1939) |
| <i>Limonium pruinosum</i> (L.) Chaz. subsp. <i>pruinosa</i> | <i>Limonium pruinosum</i> subsp. <i>alleizettei</i> (Pau) Maire (1931) |

I.4. Etudes chimiques antérieures :

La recherche bibliographique que nous avons menée sur *Limonium pruinosum* (Plombaginacée) confirme que cette espèce n'a fait l'objet que de deux études phytochimiques algériennes, et plusieurs études étrangères qui ont permis d'isoler et d'identifier vingt un produits naturels.

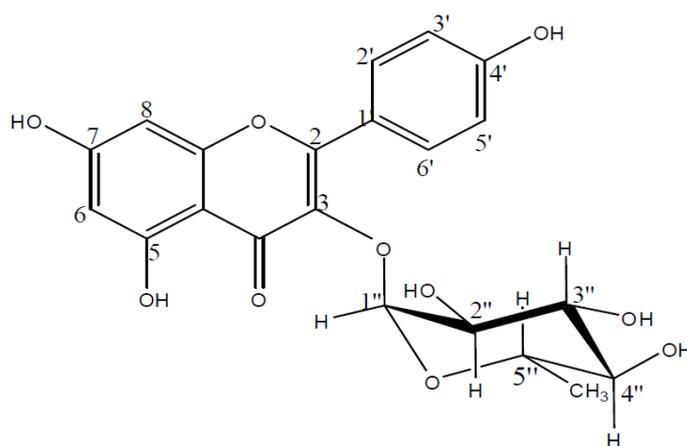
I.4.1. Les flavonoïdes :**Tableau I.3 :** Flavonoïdes isolés de l'espèce *Limonium pruinosum*

| N° de structure | | Nom du composé | Réf |
|-----------------|-----------|--|------|
| <u>1</u> | <u>1a</u> | Méricétine 3-O-(6''O-Galloyle-gluco-pyranoside) | [36] |
| | <u>1b</u> | Méricétine-3-O- β -Gluco-pyranoside | |
| <u>2</u> | | Kampférol-3-O-Rhamnopyranoside | [35] |
| <u>3</u> | <u>3a</u> | Quéricétine-3-O-Arabinofuranoside | [37] |
| | <u>3b</u> | Méricétine-3-O-Arabinofuranoside. | [38] |
| <u>4</u> | <u>4a</u> | Méricétine-3-O- β -Galactopyranoside. | [36] |
| | <u>4b</u> | Quéricétine-3-O- β -Galactopyranoside | |
| <u>5</u> | <u>5a</u> | Apigénine | [35] |
| | <u>5b</u> | 3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone ou bien 7,3'-diméthyl quercétine | [39] |
| | <u>5c</u> | 3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone ou bien 3'-méthyl quercétine. | |
| <u>6</u> | | Quéricétine-3-O- Rhamnopyranoside | [36] |



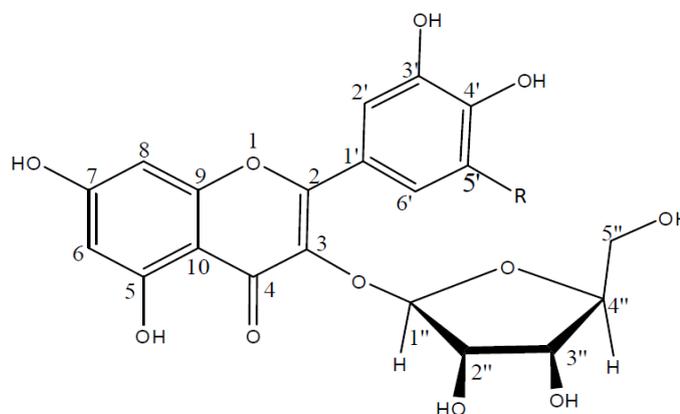
| | |
|-----------|---------------------------------|
| | R |
| 1a | (6''O-Galloyle-glucopyranoside) |
| 1b | OH |

1

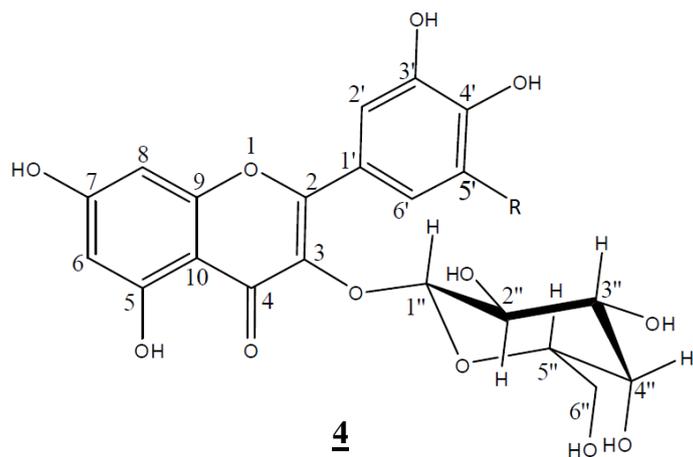


2

| | |
|-----------|----------|
| | R |
| 3a | H |
| 3b | OH |

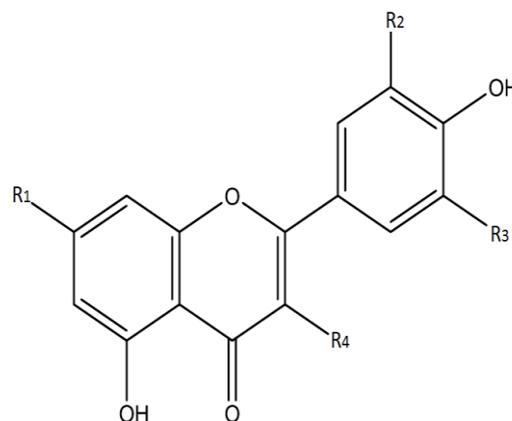


3

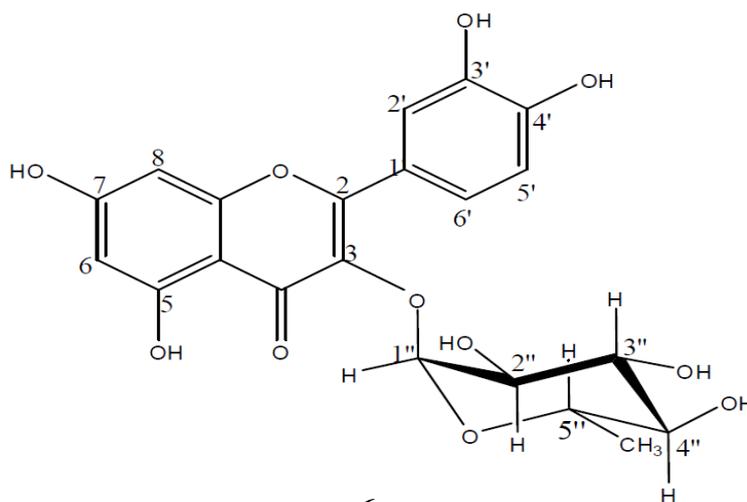


| | |
|------------------|-----------|
| | R |
| <u>4a</u> | OH |
| <u>4b</u> | H |

| | | | | |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| | R1 | R2 | R3 | R4 |
| <u>5a</u> | OH | H | H | H |
| <u>5b</u> | OCH3 | H | OCH3 | OH |
| <u>5c</u> | OH | OCH3 | H | OH |



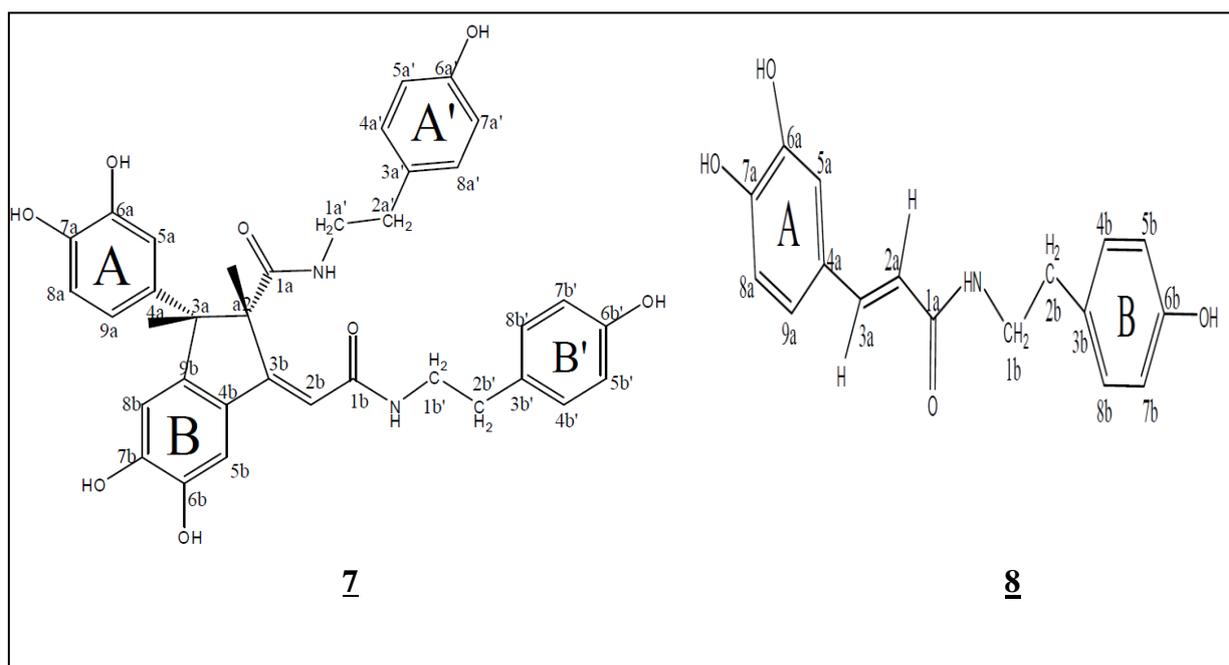
5

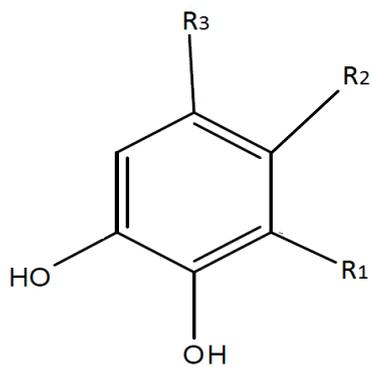


I.4.2. Divers :

Tableau I.4 : Autres produits isolés de l'espèce *Limonium pruinosum*

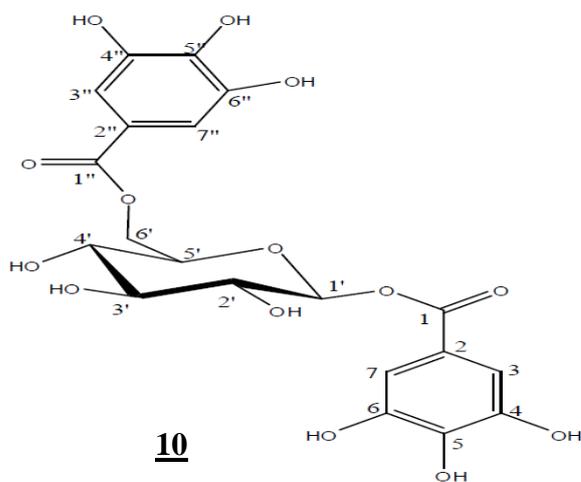
| N° de structure | Nom du composé | Réf | |
|-----------------|--|--|------|
| <u>7</u> | Limoniastramide | [40] | |
| <u>8</u> | N-E-caffeoyl tyramine | | |
| <u>9</u> | <u>9a</u> | L'acide gallique | [41] |
| | <u>9b</u> | L'acide caféique | [35] |
| <u>10</u> | 1,6-O-Digalloyle- β -D-glucopyranose | [42] | |
| <u>11</u> | 6'-O-sulfonyl-salidroside | [36] | |
| <u>12</u> | <u>12a</u> | Méthyle Gallate | [41] |
| | <u>12b</u> | 3,4-dihydroxy-5-méthoxybenzoate de méthyle | [43] |
| <u>13</u> | Méthyl- β -D-glucopyranoside | [43] | |
| <u>14</u> | D-Pinitol | | |



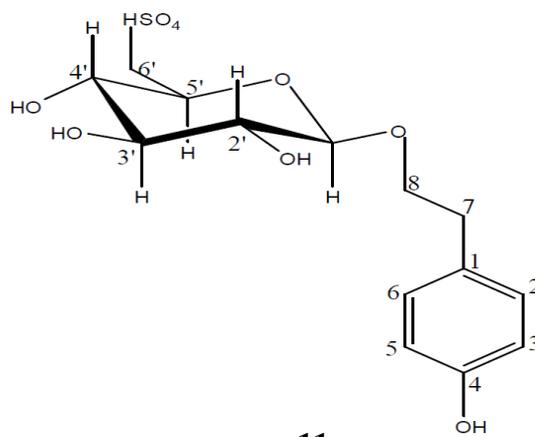


| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 9a | OH | H | COOH |
| 9b | H | CH=CH-COOH | H |

9

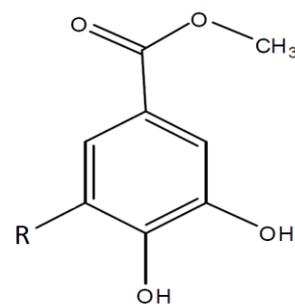


10

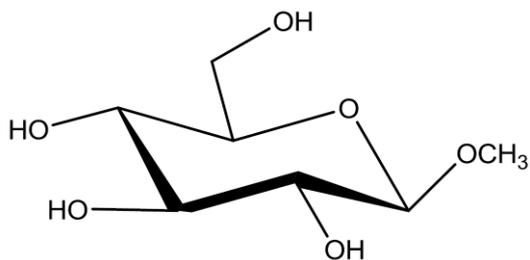


11

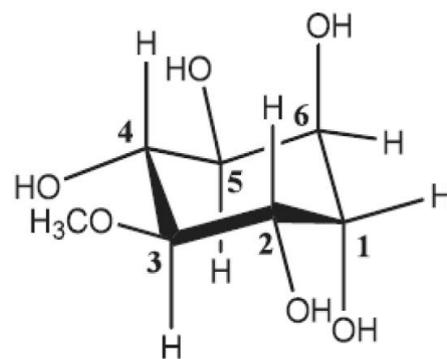
| | R |
|------------|------------------|
| 12a | OH |
| 12b | OCH ₃ |



12



13



14

CHAPITRE II

LES FLAVONOÏDES

II.1.Généralité :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal et dans tous les organes de plantes supérieures : feuilles, fleurs, racines, écorce, pollen, nectar et graines [44]. Ce sont des pigments responsables de la coloration des végétaux qui sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultra-violet (UV) [45].

Les flavonoïdes, ensemble très diversifié de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, tirent leur origine du mot grec « flavus » qui veut dire jaune [46].

On les retrouve généralement à l'état libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. A l'heure actuelle, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, les fruits et les légumes [47].

II.2.Structure :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [48] généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupement hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule. (Figure II.1) [49].

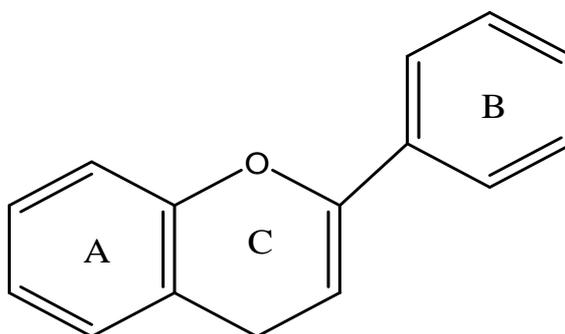


Figure II.1: Squelette de base des flavonoïdes

II.3. Classification des flavonoïdes

Ils se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont [50] :

II 3.1.Flavones et flavonols :

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 [51].

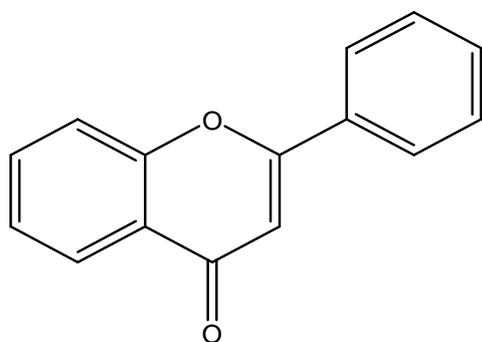


Figure II.2 : Flavone

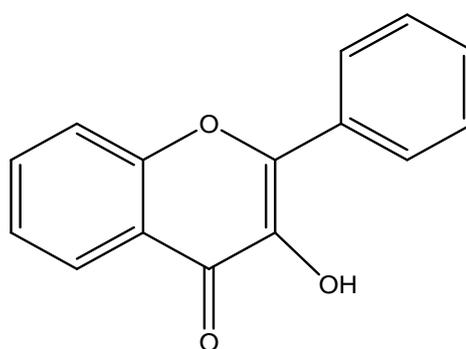


Figure II.3 : Flavonol

II.3.2.Flavanones et dihydroflavonols :

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 [52].

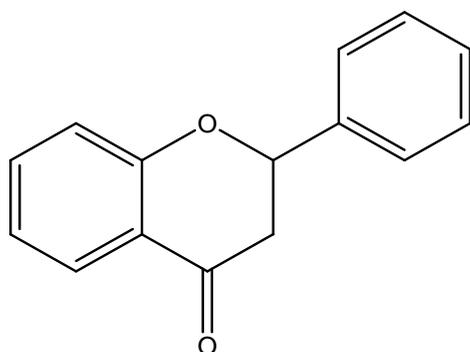


Figure II.4 : Flavanone

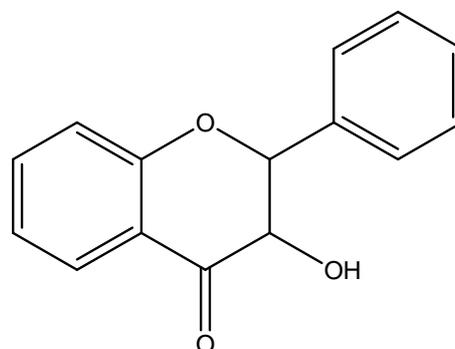


Figure II.5 : Dihydroflavonol

II.3.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols :

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés.

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine [53].

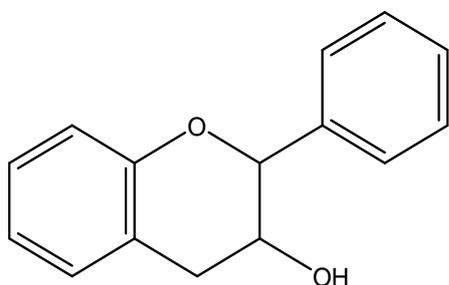


Figure II.6 : Flavan-3-ol

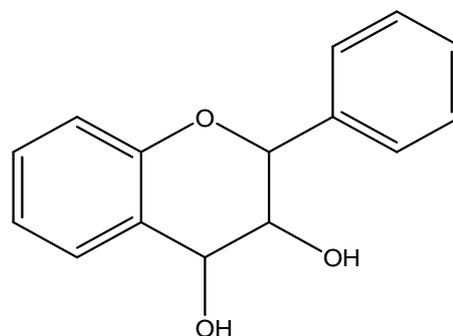


Figure II.7 : Flavan-3,4-diols

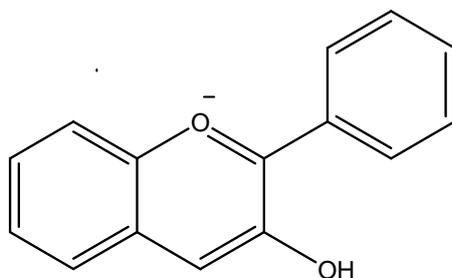


Figure II.8 : Anthocyanidol

II.3.4. Chalcones et aurones :

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone [52,53].

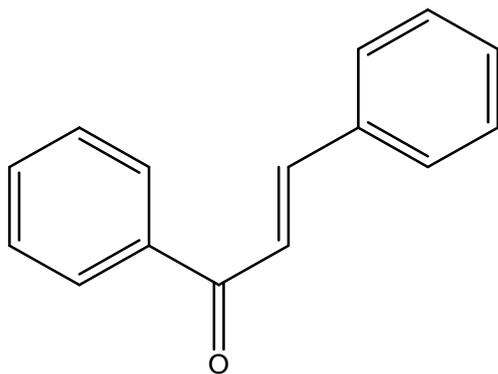


Figure II.9 :Chalcone

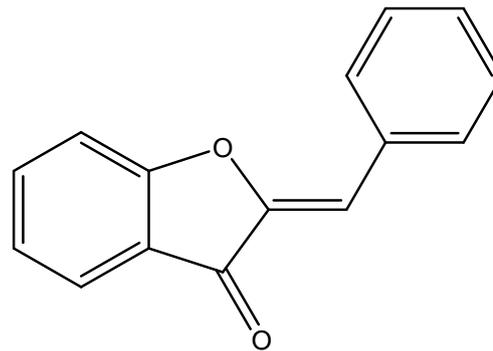


Figure II.10 : Aurone

II.3.5. Isoflavone :

Les isoflavones sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses [54]. La structure des isoflavones ne diffère des autres flavonoïdes que par la présence du cycle B en position 3.

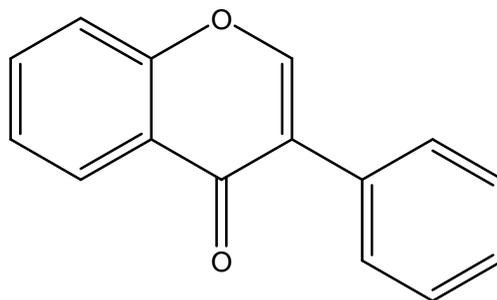


Figure II.11 :Isoflavone

II.4. Substitution du squelette flavonique :

II.4.1. L'hydroxylation :

En général, pour les flavones et les flavonols, et selon les réactions de biogenèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [55].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes hydroxylases [56]. Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [57].

II.4.2. La méthylation ou méthylation :

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransférase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [56,58].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [56].

II.4.3. La O-glycosylation :

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose). La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glycosyltransférase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose).

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 [59].

II.4.4. La C-glycosylation :

Ces composés ne sont pas rares. La liaison s'établit entre le carbone anomérique de l'ose et le carbone 8 ou 6 de l'aglycone lequel est le plus souvent une flavone. On connaît des di-C-glycosylflavonoïdes ainsi que des O-acyl-C-glycosyl-flavonoïdes [60].

II .5. Activités biologiques des flavonoïdes :

II.5.1. Activité anti-oxydante :

L'oxygène est essentiel à la vie, mais en même temps représente une source d'agression constante pour les organismes vivants par les radicaux libres. Si la production de ces derniers n'est pas contrôlée d'une manière adéquate, ces formes réactives de l'oxygène causent des dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, modifiant leurs propriétés et par là, la structure et la fonction des cellules. Les radicaux libres participent à la pathogenèse d'un nombre croissant de maladies, dont le cancer et l'artériosclérose. Ils

sont aussi impliqués dans l'asthme, l'inflammation, la neurodégénérescence, la maladie de Parkinson et le mongolisme.

Les inhibiteurs de radicaux libres tels que les polyphénols constituent de ce fait une arme relativement efficace pour la prévention et le traitement de ces diverses affections. En effet au sein de l'organisme, les flavonoïdes protègent les acides gras insaturés, les protéines et le matériel génétique. Ils contribuent également à prévenir les cancers et les maladies cardio-vasculaires, à renforcer l'activité du système immunitaire, à faire face aux polluants exogènes de toutes origines et enfin à ralentir le processus de vieillissement [61]

Les résultats obtenus pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes, ont montré que leur activité antioxydante est essentiellement liée à leur structure.

II.5.2. Autres activités biologiques des flavonoïdes :

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antiallergiques [62], anti-inflammatoires [63], antihypertenseurs [64], anti-influenzas [65], antifongiques [66], antivirales [67], antiulcéreux [62], et une activité anti-malaria [68].

II.6. Etude chimique des flavonoïdes :

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

- Extraction
- Séparation et purification
- Identification structurale des produits isolés

II.6.1. Extraction :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes. L'une de ces méthodes est adoptée par les étapes essentielles suivantes :

- ✓ La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.
- ✓ Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le chloroforme ou le dichlorométhane qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui

permet l' extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.

✓ Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement de séparation chromatographique [69,70].

II.6.2.Méthodes de séparation et de purification :

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques parmi lesquelles on peut citer :

II.6.2.a. La chromatographie sur couche mince :

Cette méthode est très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification. Elle se sert de diverses phases stationnaires et de systèmes d'élution solvants appropriés [71].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm). Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés [72].

II.6.2.b. La chromatographie sur couche mince préparative :

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silice correspondante aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. En utilisant diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés, on examine les bandes des constituants sous lumière UV ou on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat [73].

II.6.2.c. La chromatographie d'adsorption sur colonne :

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [68].

L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale [74].

II.7. Analyse structurale des flavonoïdes :

II.7.1. Généralités :

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) avec ses différents expériences (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc...), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement avec des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [71,75].

Cette dernière donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur R_f dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

II.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique :

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

La valeur du R_f varie avec la nature du couple d'éluant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose, papier) et la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition des différents substituants [72] . Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II.1 : La relation entre le Rf et la structure flavonique

| Structure flavonique | Rf |
|-------------------------------------|---|
| Augmentation des groupes hydroxyles | Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux. |
| Méthylation des hydroxyles | Rf augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux. |
| Glycosylation | Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux. |

II.7.3. La fluorescence sous lumière de Wood :

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau II.1 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [71].

Tableau II.2 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques

| La fluorescence | Les structures possibles |
|----------------------|--|
| Noire-violette | Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR. Chalcones. |
| Bleue | Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH. |
| Jaune ou jaune terne | Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH |
| Orange fluorescente | Isoflavones |
| Jaune –verte | Aurones |
| Bleue-verte | Flavanone sans 5-OH |

II.7.4. La spectrophotométrie UV-Visible :

Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes [72].

Cette méthode physique simple et rapide très utilisée dans la détermination du squelette flavonique, ainsi que la position des substituants. L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV dans le méthanol et en présence de réactifs s'appuie sur les données de la littérature.

En effet, le spectre d'absorption d'une structure flavonique présente deux bandes d'absorptions essentielles (Figure II.12) [71,72,76].

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

❖ **Bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [72].

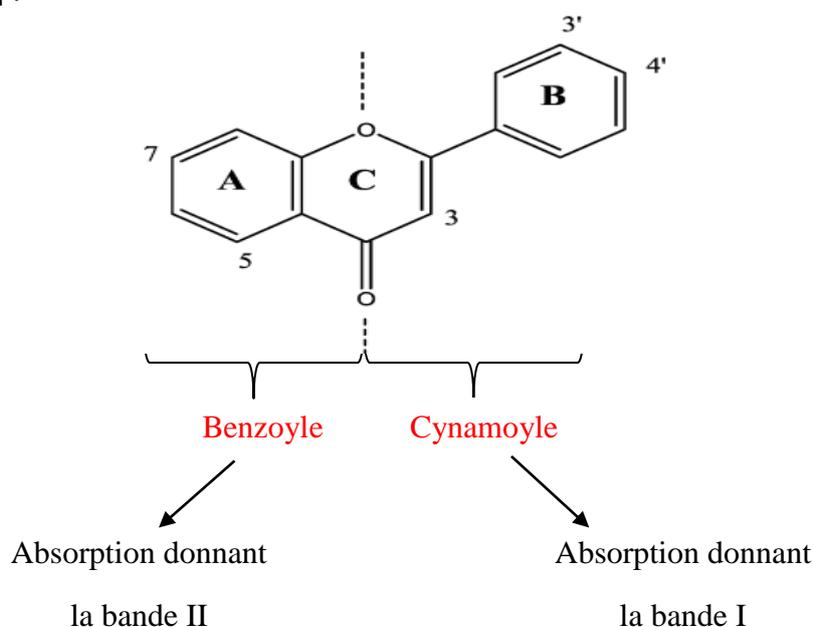


Figure II.12 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

Tableau II.3 : l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes

| Type de flavonoïdes | Bande I (nm) | Bande II (nm) |
|--------------------------------|--------------|---------------|
| Flavones | 310-350 | 250-280 |
| Flavonols (3-OH libre) | 350-385 | 250-280 |
| Flavonols (3-OH substitué) | 330-360 | 250-280 |
| Isoflavones | 310-330 | 245-275 |
| Flavanones et dihydroflavanols | 300-330 | 275-295 |

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [77].

L'emploi de réactifs tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique ; permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonique (Tableau II.4).

a)- Spectre en présence de NaOH:

NaOH ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [78]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7. Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [71].

b)- Spectre 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. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [71].

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [72], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [71].

c)- Spectre en présence de NaOAc + H₃BO₃ :

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H₃BO₃**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système ortho-dihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [71].

d)- Spectre en présence de AlCl₃ et AlCl₃+HCl :

La présence du chlorure d'aluminium (**AlCl₃**) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le **MeOH**.

Les complexes formés entre **AlCl₃** et les groupes ortho-dihydroxyles des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de **HCl** [70], par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [79,80] . Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport au spectre après addition de **AlCl₃** , et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le **MeOH**.

Tableau II.4 : Les principaux déplacements des bandes I et II après addition des réactifs

| Spectres UV en présence de réactifs | Bande II | Bande I | Substitutions | Références |
|---|-------------|--|---|------------|
| NaOH/MeOH | | +40 à 60 nm +50 à 60 nm | OH en 4' OH en 3 et 4' OR | [72] |
| | | Bande III entre les bandes I et II | OH en 7 | [80] |
| NaOAc/MeOH | + 5 à 20 nm | | OH en 7 | [72] |
| NaOAc H ₃ BO ₃ /MeOH | | +12 à 36 nm +5 à 10 nm | Ortho di-OH 3',4'- 6,7 ou 7,8 di OH | [72] |
| AlCl ₃ /MeOH | | +60 nm +35 à 55 nm | OH en 3, OH en 5 | [71] |
| AlCl ₃ +HCl/ AlCl ₃ | | -30 à -40 -20 à -25 | Ortho di OH sur le noyau B Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B | [79] |
| AlCl ₃ +HCl/ MeOH | | +35 à 55 +17 à 20 +50 à 60 | 5-OH 5-OH 3-OH ou 3-OH et 5- OH | [71] |

/ : Par rapport

+ : déplacement bathochrome

- : déplacement hypsochrome

II.7.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN-¹H) :

Le spectre RMN-¹H des composés flavoniques donne des informations sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm et il permet de connaître [81] :

- La position et le nombre des protons portés par le squelette flavonique.
- Le nombre de substituant méthoxyles portés par le squelette flavonique
- D'identifier les substituants acylés et leurs sites d'acylation.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

Les tableaux (4) et (5) contiennent quelques déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A et du noyau B [82].

Tableau II.5: Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A

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

Tableau II.6: Les déplacements chimiques et constants de couplage des protons du noyau B

| Proton du noyau B Nature de flavonoïde | (H2'-H6') δ, ppm J, Hz | (H3'-H5') δ, ppm J, Hz |
|---|------------------------|------------------------|
| Flavone (4'-OR) | 7,7-7,9 d 8,5 | 6,5-7,1 d 8,5 |
| Flavonol (4'-OR) | 7,9-8,1 d 8,5 | 6,5-7,1 d 8,5 |

- **Les protons du cycle (C) :**

Le proton H3 des flavones donne un singulier entre 6.2 et 6.4 ppm.

- **Les protons des substituant méthoxyles :**

Un ou plusieurs méthoxyles donnent des singuliers entre 3.8 et 4.5 ppm.

- **Les protons des sucres :**

Le déplacement chimique du proton anomérique H-1'' des sucres est lié à la position et la nature de la liaison entre le sucre et l'aglycone qui peut exister en deux genres : O-glycosyl ou C-glycosyl .

Le tableau suivant donne les valeurs du déplacement des protons anomériques de quelques glycosides [83] :

Tableau II.7 : Les valeurs du déplacement des protons anomériques de quelques glycosides

| H-1'' (ppm) | Nature de sucre |
|-------------|----------------------|
| 5.25-5.56 | 3-O-β-D-Glucoside |
| 5.60 | 3-O-β-D-Galactoside |
| 5.48 | 3-O-β-D-Glucuronide |
| 5.37 | 3-O-β-D-Xyloside |
| 5.31 | 3-O-α-L-Rhamnoside |
| 5.00 | 4'-O-β-D-Galactoside |
| 4.64-4.88 | 8-C-β-D-Glucoside |

CHAPITRE III
TRAVAIL PERSONNEL

III.1. Récolte et séchage de la matière végétale :

La plante *Limonium pruinatum* a été récoltée en 2015 dans la région de Batna. L'espèce a été séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires. Les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (250 g).

III.2. Le screening phytochimique :

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques [84]. Un poids bien déterminé de la matière végétale sèche (parties aériennes) a été broyé grossièrement dans un mortier.

III.2.1. L'extrait végétal hydro-alcoolique :

- ✚ On met dans un erlenmeyer :
 - ❖ 7g du matériel végétal.
 - ❖ Extrait méthanolique, 100 ml de MeOH/eau (70/30).
 - ❖ Filtration de l'extrait hydro-méthanolique après 24 h.

III.2.1.1. Le screening phytochimique des flavonoïdes :

III.2.1.1.1. Test de bate-smith (test de flavan-3, 4diols):

- ✚ On met dans les deux tubes 2 ml de l'extrait hydro-alcoolique (hydrométhanolique) dont :

- ❖ Dans le premier tube on met 2 ml de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétal (Témoin -).

- ❖ Dans le deuxième tube on met 2 ml de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétal

- ❖ Additionner dans le tube 2 l'HCl concentré (0,5ml).

- ❖ Porter au bain marie pendant 30 minutes.

- ❖ L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de Leucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols [70].

III.2.1.1.2. Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones) :

- ✚ On met dans les deux tubes 2.5 ml de l'extrait hydro-méthanolique dont :

- ❖ Dans le premier tube on met **2.5 ml** de l'extrait hydro-alcoolique du matériel végétal (Témoin -).
- ❖ Dans le deuxième tube on met **2.5 ml** de l'extrait hydro-alcoolique du matériel végétal
- ❖ Dans le tube **2** on met **0.5 ml** de l'HCl concentré.
- ❖ On ajoute tout doucement quelques fragments de magnésium, on laisse agir sous la hotte.
- ❖ L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (Flavonols) ou le rouge violacées (Flavonones et Flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes [70].

III.2.1.2. Le screening phytochimique des tannins :

✚ On met dans les quatre tubes **2 ml** de l'extrait hydro-méthanoïque dont :

Série « 01 » :

- ❖ Dans le premier tube on met **2 ml** de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétal (Témoin -).
- ❖ Dans le deuxième tube on met **2 ml** de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétal

Série « 02 » :

- ❖ Dans le premier tube on met **2 ml** de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétal (Témoin-).
- ❖ Dans le deuxième tube on met **2 ml** de l'extrait hydro-méthanolique du matériel végétale.
- ❖ Additionner **4 à 5** gouttes de gélatine à **1%** dans le tube **2 de la Serie « 01 »**.
- ❖ Additionner **4 à 5** gouttes de (FeCl₃ en solution méthanolique) dans le tube **2 de la série Serie « 02 »**.
- ❖ La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqes [85], avec précipitation dans les tests de **gélatine**.

III.2.2. L'extrait végétal étherique :

✚ On met dans un erlenmeyer:

- ❖ **7g** du matériel végétal (Broyée).
- ❖ **30 ml** éther de pétrole.
- ❖ Filtration de l'extrait étherique après **24 h**.

III.2.2.1. Le screening phytochimique des quinones :

- ✚ On met dans les **2 tubes 2 ml** de l'extrait étherique dont :
- ❖ Dans le premier tube on met **2 ml** de l'extrait étherique du matériel végétal (Témoin -).
- ❖ Dans le deuxième tube on met **2 ml** de l'extrait étherique du matériel végétal.
- ❖ On a ajouté NaOH **10%** dans le tube **2**.
- ❖ Après agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse confirme la présence des quinones [86].

III.2.2.2. Le screening phytochimique des coumarines :

- ✚ **5ml** d'extrait étherique obtenu après une macération pendant **24** heures, après évaporation à l'air libre
 - ❖ Le résidu a été repris avec **2 ml** d'eau chaude.
 - ❖ La solution est partagée entre **2** tubes à essai.
 - ❖ La présence de coumarines est révélée après ajout dans l'un des tubes de **0.5m**
 - ❖ **NH₄OH** à **25%** et observation de la fluorescence sous une lampe **UV** à **365 nm**.
- Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence de coumarines [87].

III.2.3. L'extrait végétal chloroformique :

- ✚ On met dans un erlenmeyer :
- ❖ **4g** du matériel végétal (Broyée).
- ❖ **50 ml** chloroforme et éther de pétrole (**40/10**).
- ❖ Filtration de l'extrait chloroformique après **24 h**.

III.2.3.1. Le screening phytochimique des anthraquinones :

- ✚ On met dans les **2 tubes 2 ml** de l'extrait chloroformique dont :
- ❖ Dans le premier tube on met **2 ml** de l'extrait chloroformique du matériel végétal (Témoin).
- ❖ Dans le deuxième tube on met **2 ml** de l'extrait chloroformique du matériel végétal.
- ❖ On ajoute KOH **10%** dans le tube **2**.
- ❖ Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge [88].

III.2.4. L'extrait végétal de l'acide sulfurique :

- ✚ On met dans un erlenmeyer:
- ❖ 0,2 g du matériel végétal (Broyée).
- ❖ 10 ml de l'acide sulfurique.
- ❖ Agitation pendant 2 minutes, et filtration.

III.2.4.1. Le screening phytochimique des alcaloïdes :

- ✚ On met dans les 2 tubes 2 ml de l'extrait végétal de l'acide sulfurique dont :

Série « 01 » :

- ❖ Dans le premier tube on met 2 ml de l'extrait de l'acide sulfurique du matériel végétal (Témoin -).
- ❖ Dans le deuxième tube on met 2 ml de l'extrait de l'acide sulfurique du matériel végétal.

Série « 02 » :

- ❖ Dans le premier tube on met 2 ml de l'extrait de l'acide sulfurique du matériel végétal (Témoin -).
- ❖ Dans le deuxième tube on met 2 ml de l'extrait de l'acide sulfurique du matériel végétal.
- ❖ Dans le deuxième tube on met 5 gouttes de réactif de Mayer. (série 1)
- ❖ Dans le deuxième tube on met 5 gouttes de réactif de Dragendorff. (série 2)
- ❖ La présence des alcaloïdes est constatée par des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux :
 - ✓ Blanc jaunâtre dans le premier tube.
 - ✓ Orange dans le deuxième tube [89].

III.2.5. Les saponosides :

- ✚ On prend 0.5 g de la plante dans 80 ml d'eau distillée pendant quelques minutes.

L'apparition d'une mousse dans le milieu prouve la présence des saponosides.

III.3. Extraction du matériel végétal :

Le matériel végétal est mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique (**Ethanol/Eau ; 90: 10 v :v**). Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures à température ambiante.

Après filtration et concentration sous pression réduite à une température modérée (environ 35 °C) de la solution, l'extrait dilué avec 200 ml d'eau distillée qui aide à la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation. Il est ensuite laissé au repos à froid pendant 24h afin de subir une décantation pour éliminer les graisses et résines risquant de gêner la suite des opérations, ainsi pour récupérer la phase aqueuse limpide, puis il est filtré.

On procède à des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et enfin par le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois.

Les trois phases organiques ainsi obtenues sont concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Rendements des extraits de l'espèce *Limonuim pruinorum*

| Matériel végétal | Extrait | Masse (g) | Rendement (%) |
|------------------|-------------------|-----------|---------------|
| 250 g | Dichlorométhane | 0.65 | 0.26 |
| | Acétate d'éthyle | 0.4 | 0.16 |
| | <i>n</i> -butanol | 2.5 | 1 |

Calcul de rendement :

$$R (\%) = (M_{\text{exp}}/M_{\text{mv}}) \times 100$$

R = rendement en %

Me = Masse de l'extrait en gramme

M mv =Masse de la matière végétale en gramme

Les rendements obtenus varient entre **0.16** et **1** % dont le meilleur est celui de l'extrait butanolique avec **1** %, puis de l'extrait dichlorométhane avec **0.26** % dont le plus faible est celui obtenu par l'extrait acétate d'éthyle avec **0.16**%.Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme montrant les différentes étapes du processus d'extraction (Figure III.1).

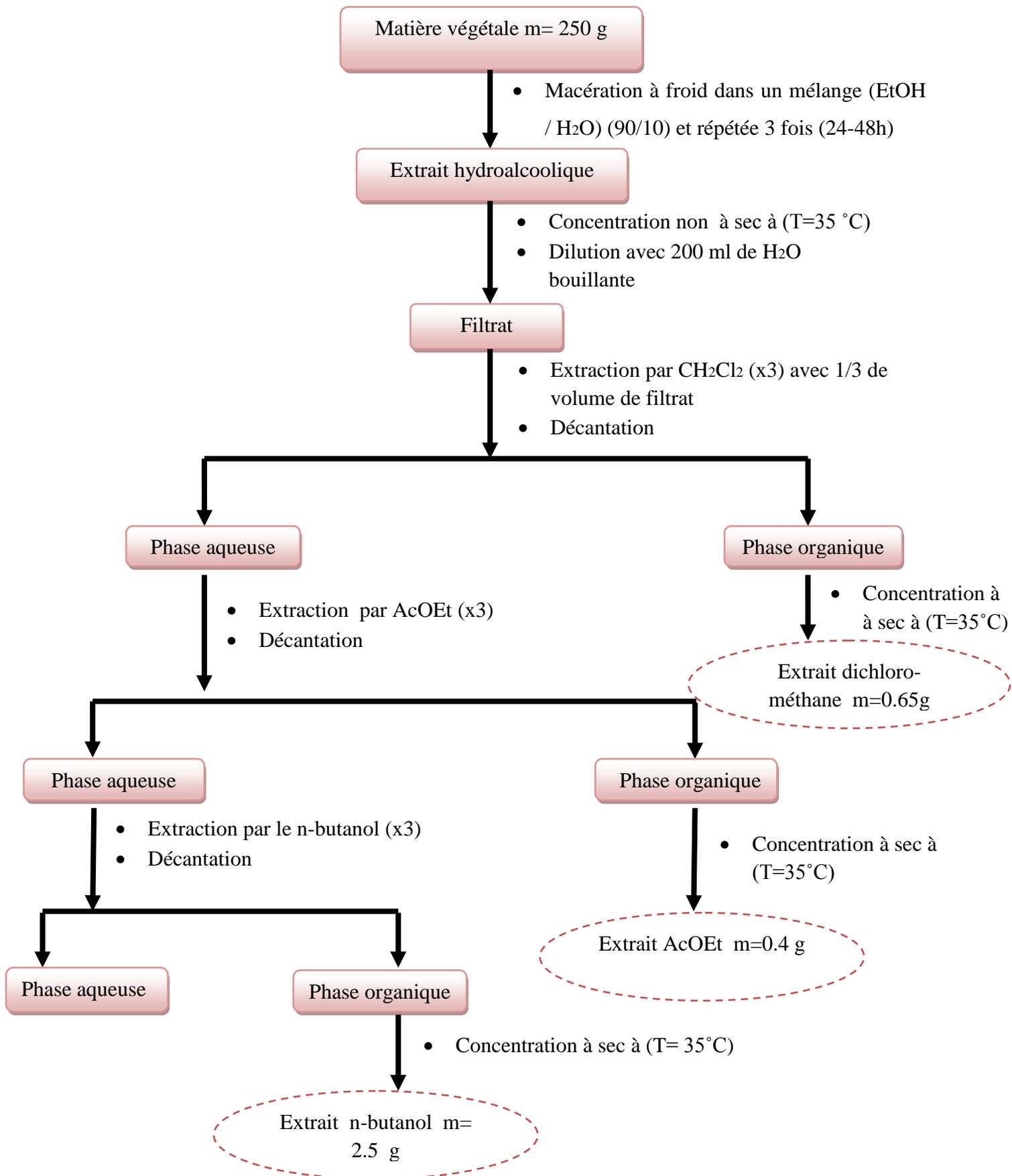


Figure III.1 : Protocole d'extraction de l'espèce *Limonium pruinosum*

III.4. Dosage des phénols totaux :

III.4.1. Principe de la méthode

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu, ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [90].

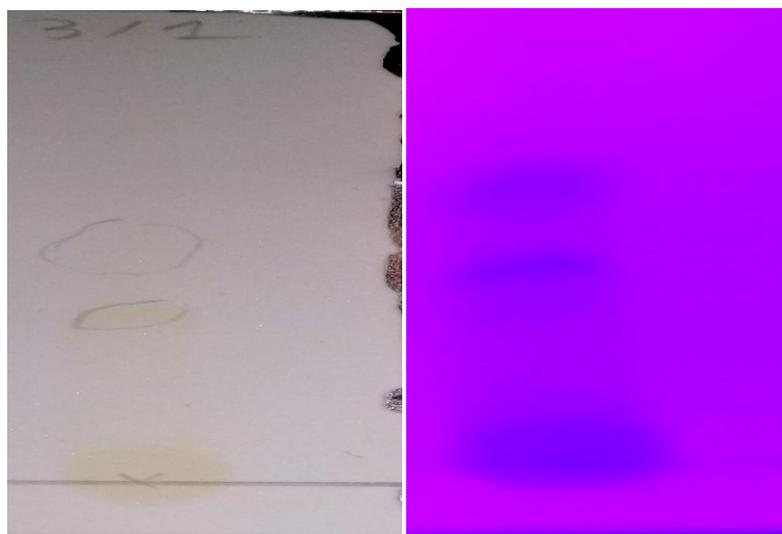
Dosage des polyphénols

La teneur totale en polyphénols a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. **0,5 ml** de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) ont été mélangés avec **0,25 ml** de chaque extrait préparé dans l'eau distillé avec une concentration de (1 mg/mL), après **4 min** à température ambiante et à l'obscurité, **2,5 ml** de carbonate de sodium (20%) ont été ajoutés.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons et de la solution étalon ont été mesurés à 760 nm avec un spectrophotomètre. Des concentrations croissantes d'acide gallique (**7,81-250 µg/ml**) ont été utilisées pour obtenir une courbe standard. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{gAGE}/\text{mg}$) [91-92].

III.5. Séparation chromatographique de l'extrait *n*-butanol :

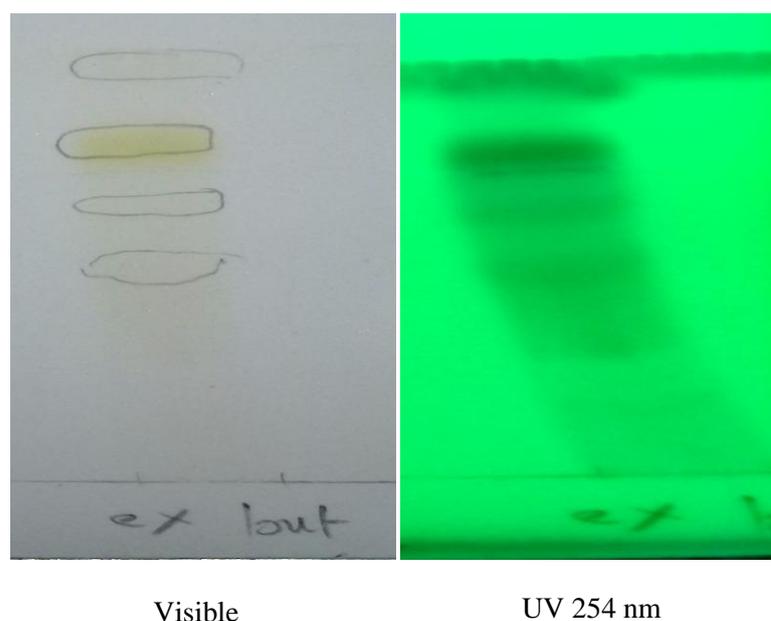
Nous avons débuté le traitement de l'extrait *n*-butanol par une chromatographie analytique sur couche mince, pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluion qui donnerait la meilleure séparation, qui est le ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) dans les proportions (3/1).



Visible

UV 365 nm

Système d'éluion ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (3/1)



Visible

UV 254 nm

Système d'élution BAW (6/1/2)

Figure III.2 : Profil chromatographique de l'extrait *n*-butanol dans deux systèmes d'élution

III.5.1. Séparation chromatographique sur colonne :

Une masse de 2 g de l'extrait *n*-butanol dissout dans le méthanol est mélangé avec une petite quantité de gel de silice normal, l'ensemble est séché sous vide, puis broyée jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. L'élution est effectuée avec un gradient de polarité croissante chloroforme / méthanol (100/ 0 à 0/ 100).

Les fractions de colonne obtenues ont subi des tests sur chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support aluminium, ce qui nous a permis de réunir les fractions ayant des comportements chromatographiques semblables donnant ainsi 14 fractions en tout.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV à (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 minutes à 100 C°. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Regroupement des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait butanolique de *Limonium pruinatum*

| Lot de fractions | N° de la fraction | Système d'éluion | | | Observations |
|------------------|-------------------|---------------------|--------|-----------------------------|-------------------|
| | | % CHCl ₃ | % MeOH | Le poids de la fraction (g) | |
| 1-7 | F1 | 100 | 0 | 0.12 | Graisse |
| 8-11 | F2 | 98 | 2 | 0.05 | Produit pur |
| 12-15 | F3 | 98 | 2 | 0.11 | Produit pur |
| 16-19 | F4 | 96 | 4 | 0.16 | Mélange séparable |
| 20-22 | F5 | 90 | 10 | 0.14 | Mélange séparable |
| 23-29 | F6 | 80 | 20 | 0.17 | Mélange séparable |
| 30 | F7 | 70 | 30 | 0.1 | Mélange complexe |
| 31-33 | F8 | 70 | 30 | 0.16 | Mélange complexe |
| 34 | F9 | 60 | 40 | 0.12 | Mélange séparable |
| 35-36 | F10 | 60 | 40 | 0.11 | Mélange complexe |
| 37 | F11 | 60 | 40 | 0.12 | Mélange complexe |
| 38-41 | F12 | 50 | 50 | 0.13 | Mélange complexe |
| 42-44 | F13 | 40 | 60 | 0.19 | Mélange complexe |
| 45 | F14 | 0 | 100 | 0.15 | Mélange complexe |

III.5.2. Analyse chromatographique sur couche mince des fractions :

Les 14 fractions obtenues sont testées dans trois systèmes différents qui sont : CHCl₃/MeOH , AcOEt /MeOH /H₂O , BAW .On constate que les plaques de CCM des fractions 2 et 3 dans le système CHCl₃/MeOH montrent une monotache .

Les autres fractions sont des mélanges séparables et complexes comme montre le tableau III.2.

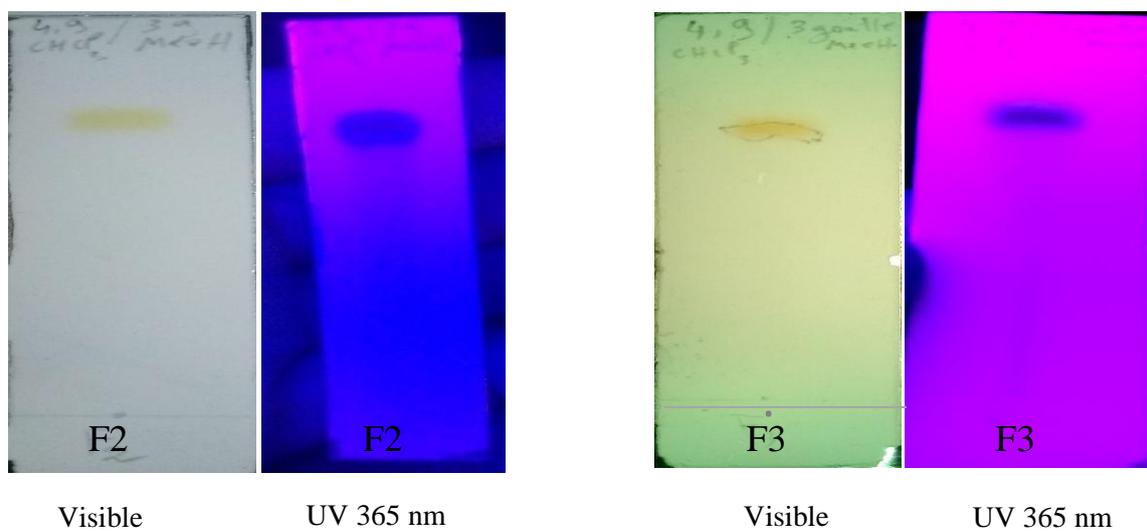


Figure III.3: Profil chromatographique de F2 et F3 dans le système d'élution (CHCl₃/MeOH) (4.9 / 0.1)

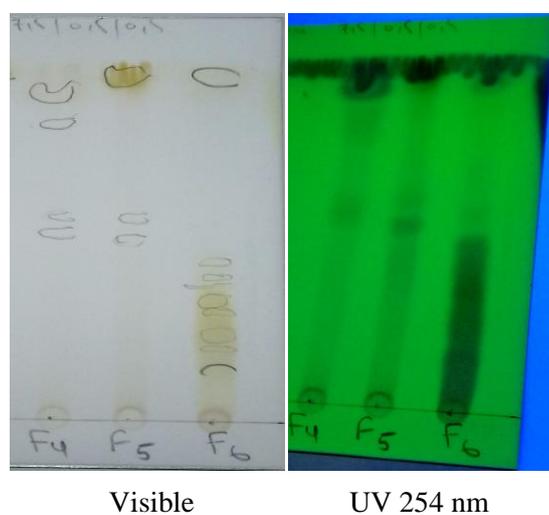


Figure III.4: Profil chromatographique des fractions 4, 5 et 6 dans le système d'élution (AcOEt / MeOH / H₂O) (7.5/0.5/0.5)

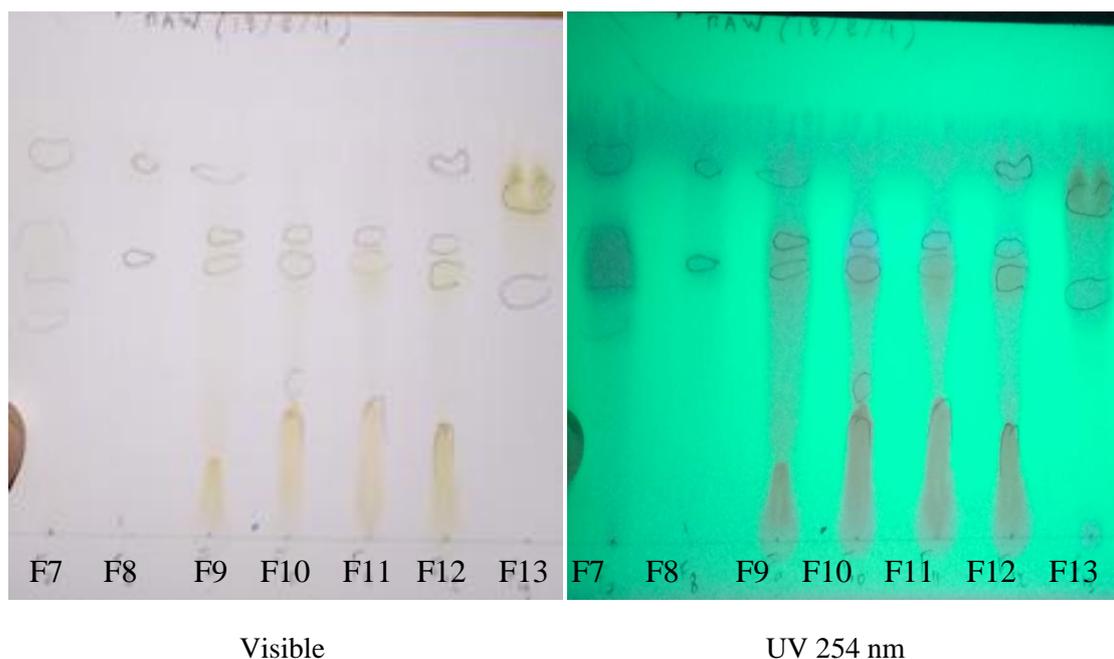


Figure III.5 : Profil chromatographique des fractions 7, 8, 9, 10, 11,12 et 13 dans le système d'élution BAW (12/2/4)

III.5.3.Séparation et purification des fractions :

Parmi les 14 fractions obtenues, on a procédé au traitement de la fraction 2 à cause de sa pureté et de sa couleur jaune sous lumière UV 365 nm ce qui permet à proposer l'existence d'une structure flavonoïde, ainsi l'étude de la fraction 9 à cause de la présence d'une tache jaune sur la plaque CCM dans le visible , sa fluorescence est noire-violette sous lumière UV 365 nm, ce qui indique la présence d'un flavonoïde .

III.5.3.1.Traitement de F2 :

La fraction 2 (50 mg) renferme un produit majoritaire soluble partiellement dans le MeOH et soluble totalement dans le DMSO. Ce produit est purifié par lavages successifs à l'aide d'un mélange de CHCl_3 /MeOH, la masse du produit pur obtenu est de 12 mg.

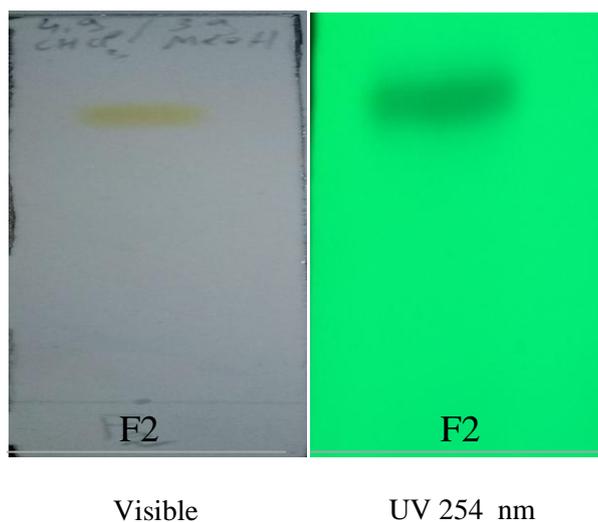


Figure III.6 : Profil chromatographique de la fraction 2 dans le système d'élution ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (4.9/ 0.1)

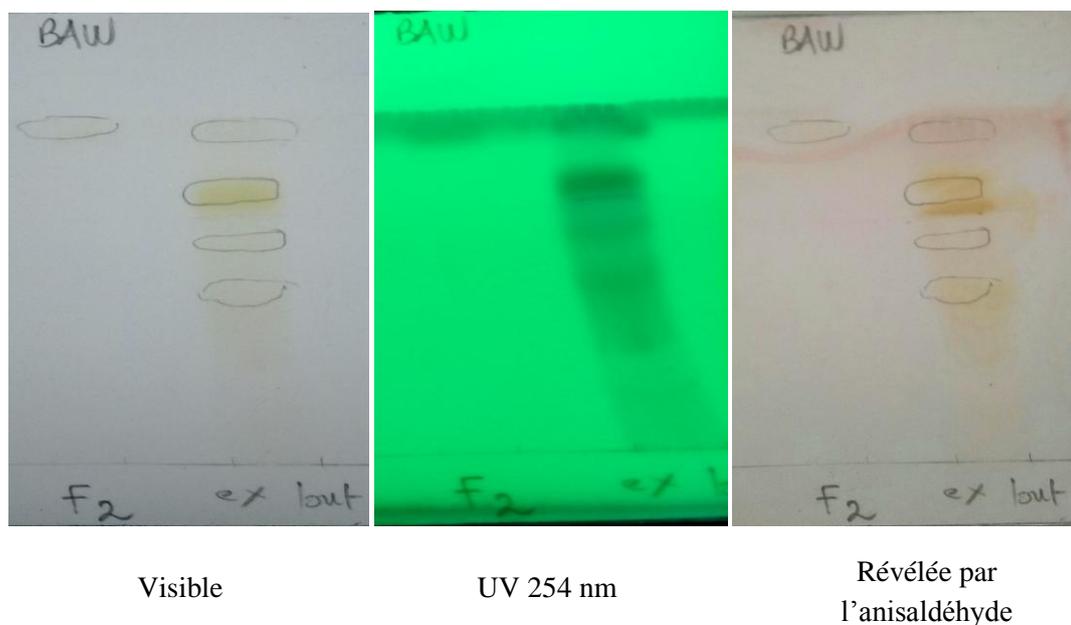


Figure III.7 : Profil chromatographique de la fraction 2 par rapport au l'extrait butanolique dans le système d'élution BAW (6/1/2)

La fraction 2 a été élué sur plaque chromatographique gel de silice dans 2 systèmes d'élution , les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.3 : Comportement chromatographique de F2 sur plaque de Silice dans deux systèmes d'élution (CHCl₃/MeOH) (4.9/0.1) et (n-butanol/Acide acétique/eau) (6/1/2)

| Système | La couleur en visible | La couleur sous lumière UV 365 nm | Rf |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------|
| CHCl ₃ /MeOH (4.9/0.1) | Jaune | Jaune | 0.85 |
| n-butanol/Acide acétique/eau (6/1/2) | Jaune | Jaune | 0.87 |

III.5.3.2. Traitement de F9 :

Après l'analyse de la fraction 9 (120 mg) par chromatographie sur couche mince, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant (n-butanol/Acide acétique/eau) dans les proportions (6/1/2) comme montre la figure suivante :

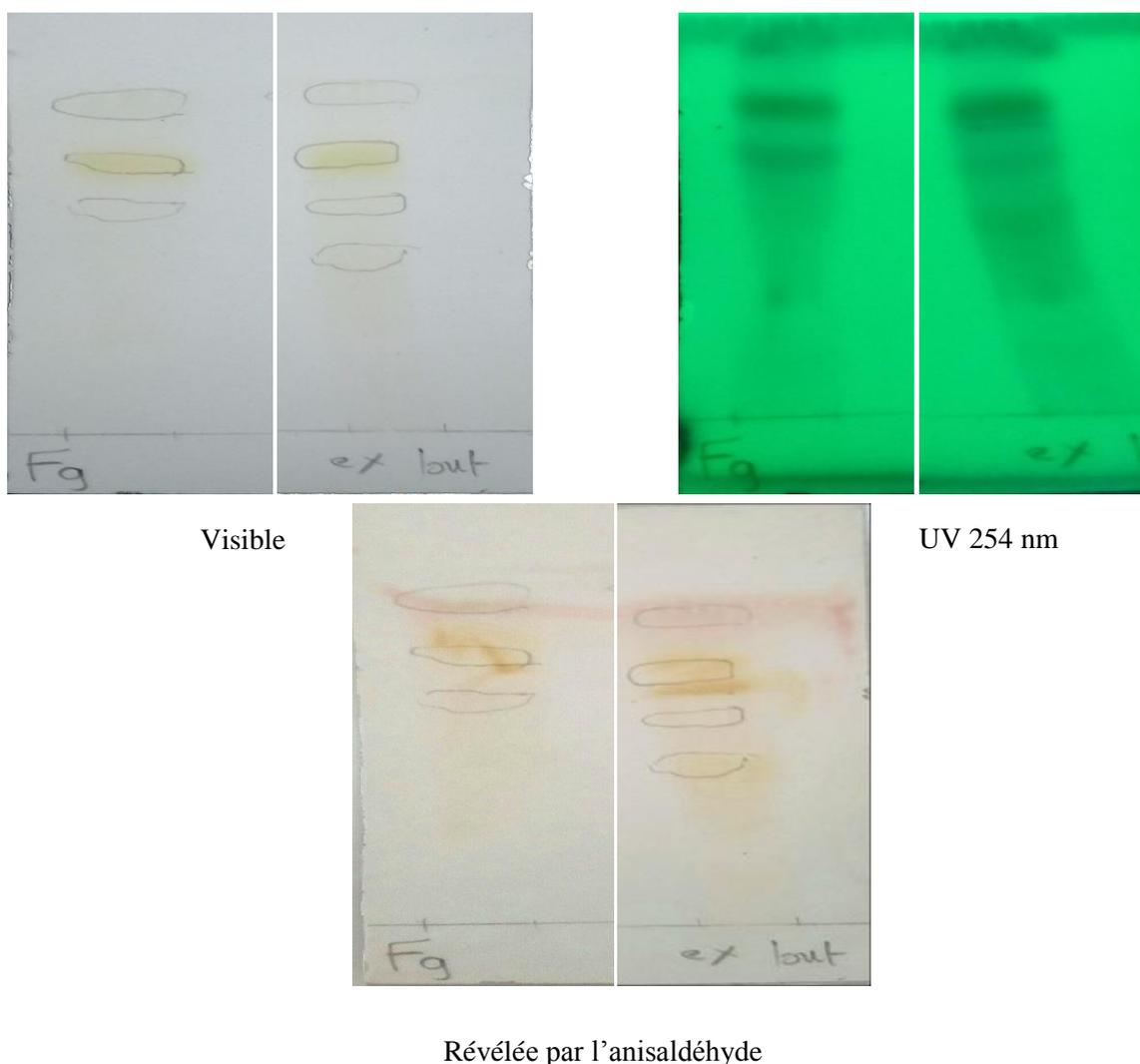


Figure III.8: Profil chromatographique de la fraction 9 par rapport au l'extrait butanolique dans le système d'élution BAW (6/1/2)

La fraction 9 a été éluée sur plaque chromatographique gel de silice dans un système d'éluion , les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.4 : Comportement chromatographique de F9 sur plaque de Silice dans un système d'éluion (n-butanol/Acide acétique/eau) (6/1/2)

| Système | Numéro de spot | La couleur en visible | La couleur sous lumière UV 365nm | Rf |
|--|----------------|-----------------------|----------------------------------|------|
| (n-butanol/Acide acétique/eau) (6/1/2) | Spot 1 | Incolore | Incolore | 0.81 |
| | Spot 2 | Jaune | Violette noire | 0.68 |
| | Spot 3 | Incolore | Incolore | 0.56 |

Pour réaliser l'étape de la séparation , on a procédé à l'éluion de cette fraction dans le système précédent, la bande choisie est celle de la couleur noire-violette sous lampe UV à 365 nm et de couleur jaune dans le visible a été récupérée de la plaque par grattage de la zone de silice correspondante à cette bande, puis l'extraire avec du méthanol, ensuite filtrer.

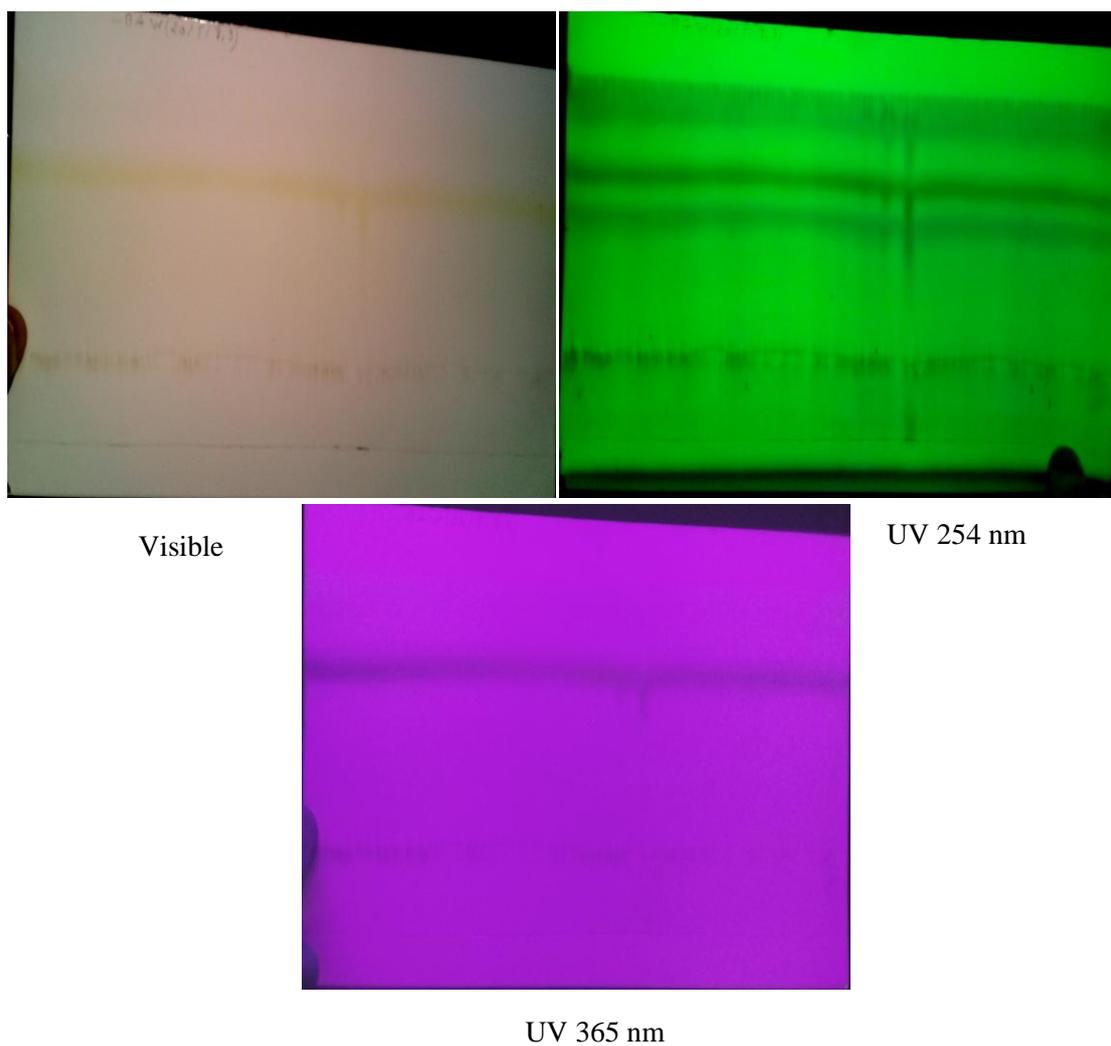


Figure III.9 : Profil chromatographique de purification de la fraction 9 dans le système d'élution BAW (6/1/2)

Dans le but de confirmer la pureté de produit obtenu, une élution a été réalisée par CCM avec le même système d'élution BAW, ce qui a donné une monotache (Figure III.10).

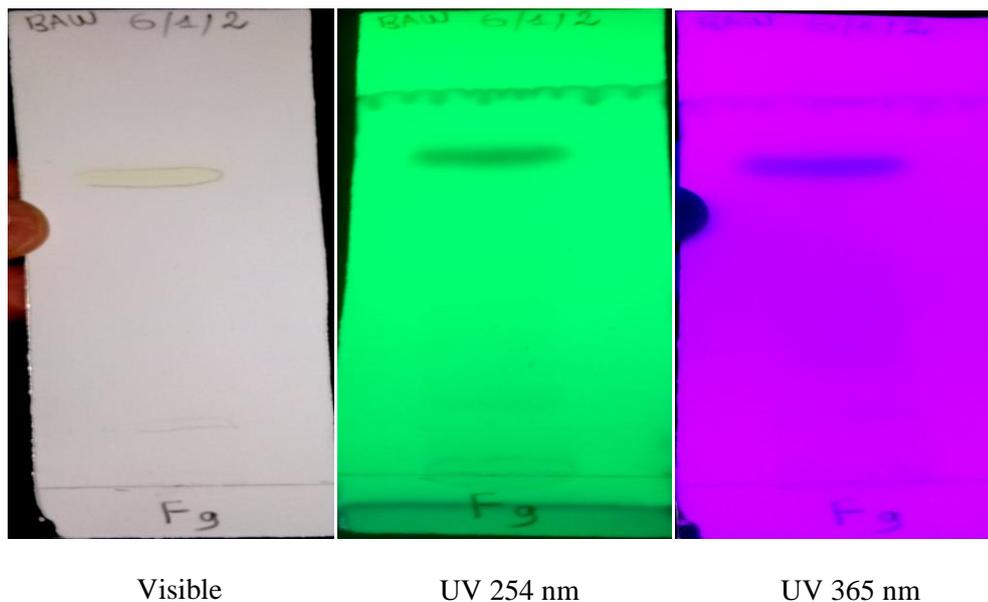


Figure III.10 : Profil chromatographique de la fraction 9 après purification

La valeur du R_f enregistrée pour ce produit après la séparation est donnée dans le tableau suivant :

Tableau III.5 : Comportement chromatographique de F9 dans le système d'éluion (n-butanol/Acide acétique/eau) (6/1/ 2) après la séparation

| Système | R_f |
|---------------------------------------|-------|
| n-butanol/Acide acétique/eau 6/1/2 | 0.71 |

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Les résultats du screening phytochimique :

Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits contenant des substances naturelles, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau et les figures ci-dessous.

Tableau IV.1 : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans l'espèce *Limonium pruinatum*

| Composés recherchés | L'espèce <i>Limonium pruinatum</i> | |
|---|------------------------------------|-------------------|
| | Présence /absence | Coloration |
| Flavan 3,4 diols (Test de Bath -Smith) | ++ | Rouge |
| Flavonols (Test de Wilstater) | ++ | Rouge Pourpre |
| Flavonols et flavonones (Test de Wilstater) | - | / |
| Tannins (Test de gélatine) | - | / |
| Tannins (Test de FeCl ₃) | +++ | Brune verdâtre |
| Quinones | - | / |
| Coumarines | - | / |
| Anthraquinones | - | / |
| Alcaloïdes (Test de Dragendorff) | - | / |
| Alcaloïdes (Test de Mayer) | - | / |
| Saponosides | - | / |

(-) Résultat négatif, (+) Résultat faiblement positif, (++) Résultat positif, (+++) Résultat fortement positif.

Voir annexe

D'après les résultats du screening phytochimique nous constatons que : nos extraits contiennent des flavonoïdes de types flavan3,4 diols , flavonols, et des tannins en quantités très importantes par rapports aux autres classes de métabolites secondaires. Ces résultats confirment que cette plante n'est pas très riche en métabolites secondaires.

IV.2. Résultats de dosage des polyphénols :

Détermination du contenu total en polyphénols

La teneur phénolique total des deux extraits de AcOEt et *n*-BuOH estimé par la méthode de Folin-ciocalteu. Les résultats ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage (Figure IV.11), en utilisant l'acide gallique comme standard, qui suit une équation de type :

$$y = 0,0145 x + 0,1477$$

$$R^2 = 0,9953$$

- ✓ Les valeurs obtenues pour la concentration en phénols totaux sont exprimées en EAG mg/g.

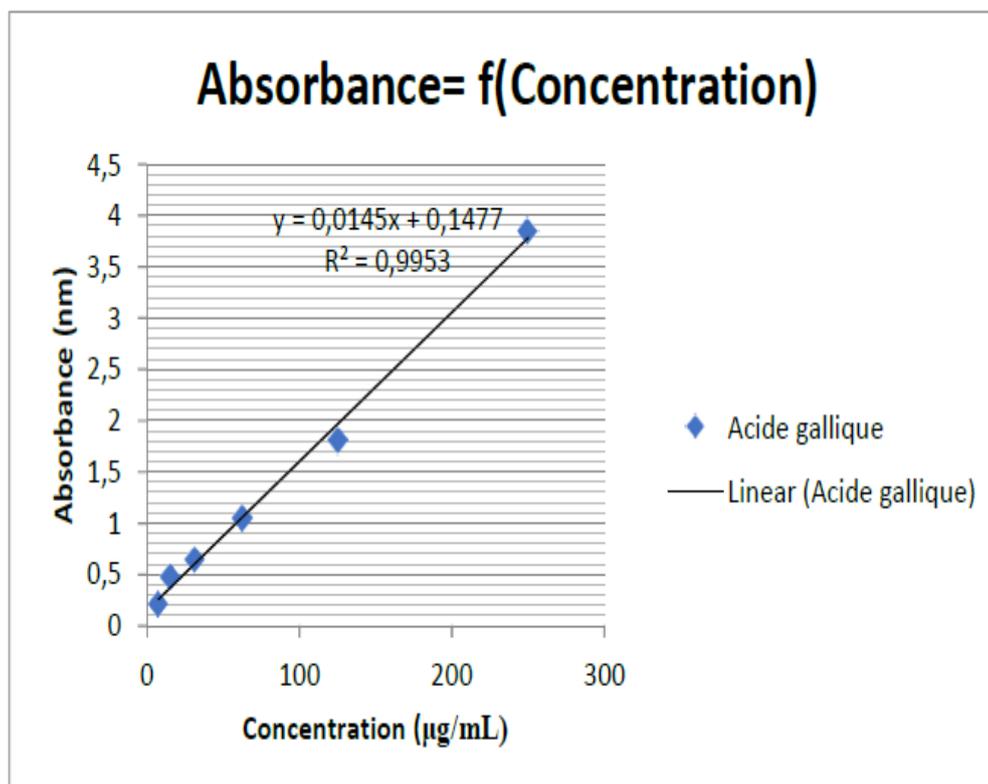


Figure IV.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La quantification des polyphénols des trois extraits a été représentée dans le tableau suivant :

Tableau IV.2 : Résultats du dosage des polyphénols

| Les extraits | Absorbance 1 | Absorbance 2 | Moyenne | EAGmg/ gES |
|----------------|--------------|--------------|---------|------------|
| AcOEt | 0.445 | 0.442 | 0.4435 | 20.40 |
| <i>n</i> -BuOH | 0.903 | 0.910 | 0.9065 | 52.33 |

AG : acide gallique, **EAG** : équivalent d'acide gallique, **ES** : poids sec de l'extrait.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que les teneurs en polyphénol totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait ***n*-BuOH** enregistre un maximum de polyphénol (**52.33 EAGmg/PSg**) ce qui indique la richesse de cet extrait en polyphénol par rapport à l'extrait **AcOEt** qui renferme une teneur plus faible (**20.40 EAGmg/ PSg**).

Les résultats sont résumés dans la figure suivante :

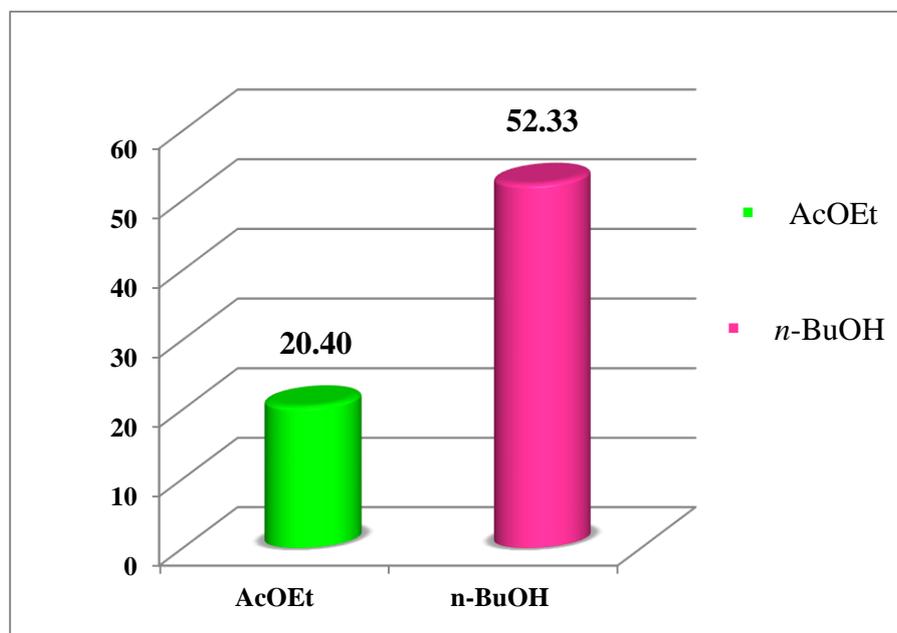


Figure IV.2 : Contenu total en polyphénol totaux des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH

IV.3. Identification de structure du composé F2 :

Le composé F2 est caractérisé par une couleur jaune sous lumière UV 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde .

IV.3.1. La spectrophotométrie UV :

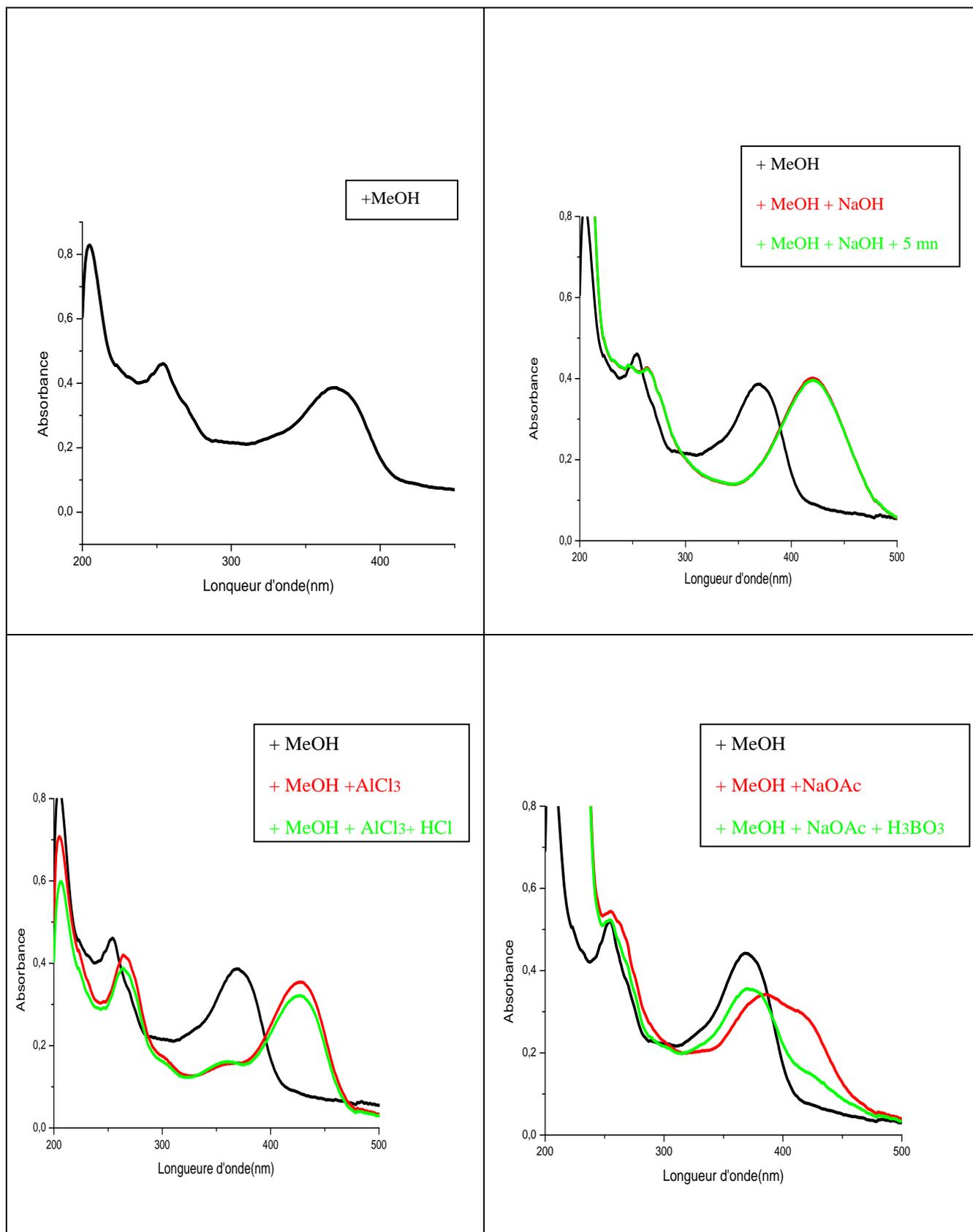
L'étude de la série spectrale UV (spectre IV.1) montre que :

- ❖ Le maximum d'absorption de la bande I à 370 nm dans le spectre enregistré dans le MeOH indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol.
- ❖ L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +51$ nm) avec une augmentation de l'intensité indiquent la présence d'un OH libre en 4'.
- ❖ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement très faible de la bande II ($\Delta\lambda = +1$ nm) par rapport au spectre MeOH suppose la présence d'un OR en position 7. Cette supposition est confirmée par l'absence d'une nouvelle bande sur le spectre enregistré dans le NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH .
- ❖ L'addition de H_3BO_3 ne provoque aucun déplacement de la bande I dans le spectre ce qui exclue la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($AlCl_3 + HCl$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda = +58$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5.

Les données relatives à la série spectrale UV de ce composé sont rassemblées dans le tableau IV.3 .

Tableau IV.3 : Données de la série spectrale UV du composé F2

| Réactifs | Bande II (nm) | Bande I (nm) | Observations |
|------------------|---------------|--------------|--|
| MeOH | 254 | 370 | Flavonol |
| NaOH | 264 | 421 | OH libre en 4' Pas de OH libre en 7 |
| NaOH après 5 mn | 264 | 421 | Spectre stable |
| NaOAc | 255 | 385 | OR en 7 |
| NaOAc+ H_3BO_3 | 255 | 370 | Pas de ortho di-OH sur le cycle B |
| $AlCl_3$ | 264 | 429 | / |
| $AlCl_3+HCl$ | 264 | 428 | OH libre en 5 |



Spectre IV.1 : Série spectrale UV du composé F2

Ces résultats permettent de proposer la structure partielle suivante :

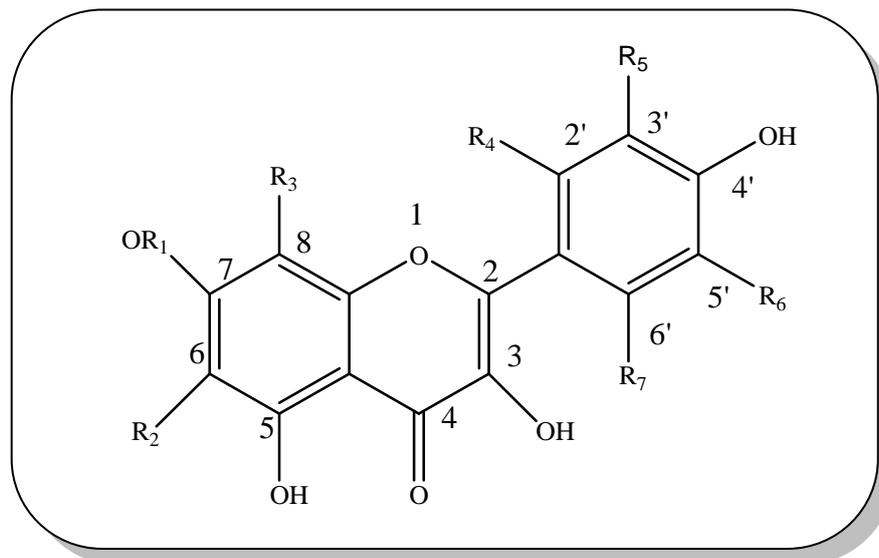


Figure IV.3 : La structure partielle du composé F2

IV.3.2. La spectrométrie RMN-¹H:

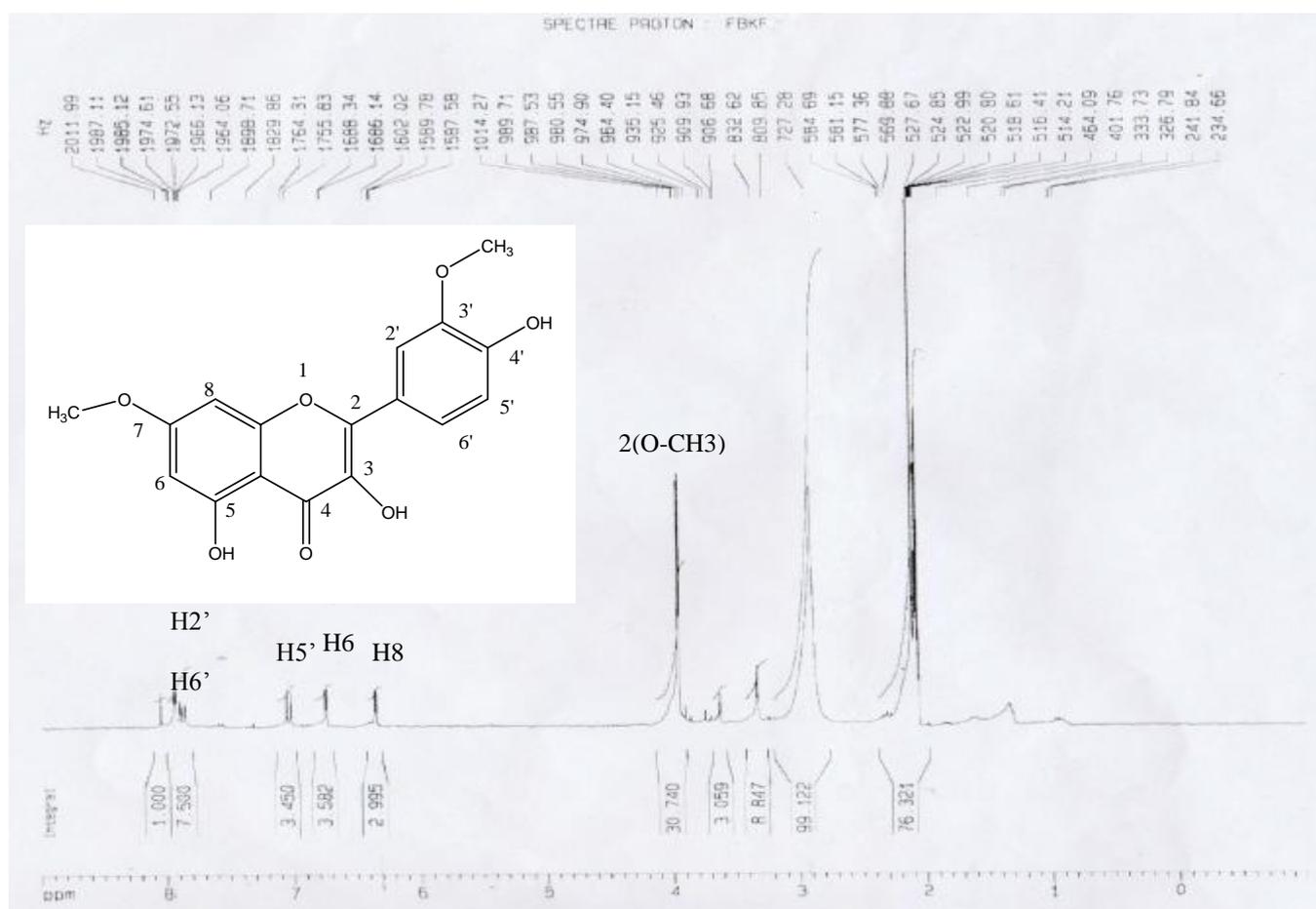
L'examen du spectre RMN-¹H (spectre IV.2) du composé F2 permet de tirer les indications suivantes :

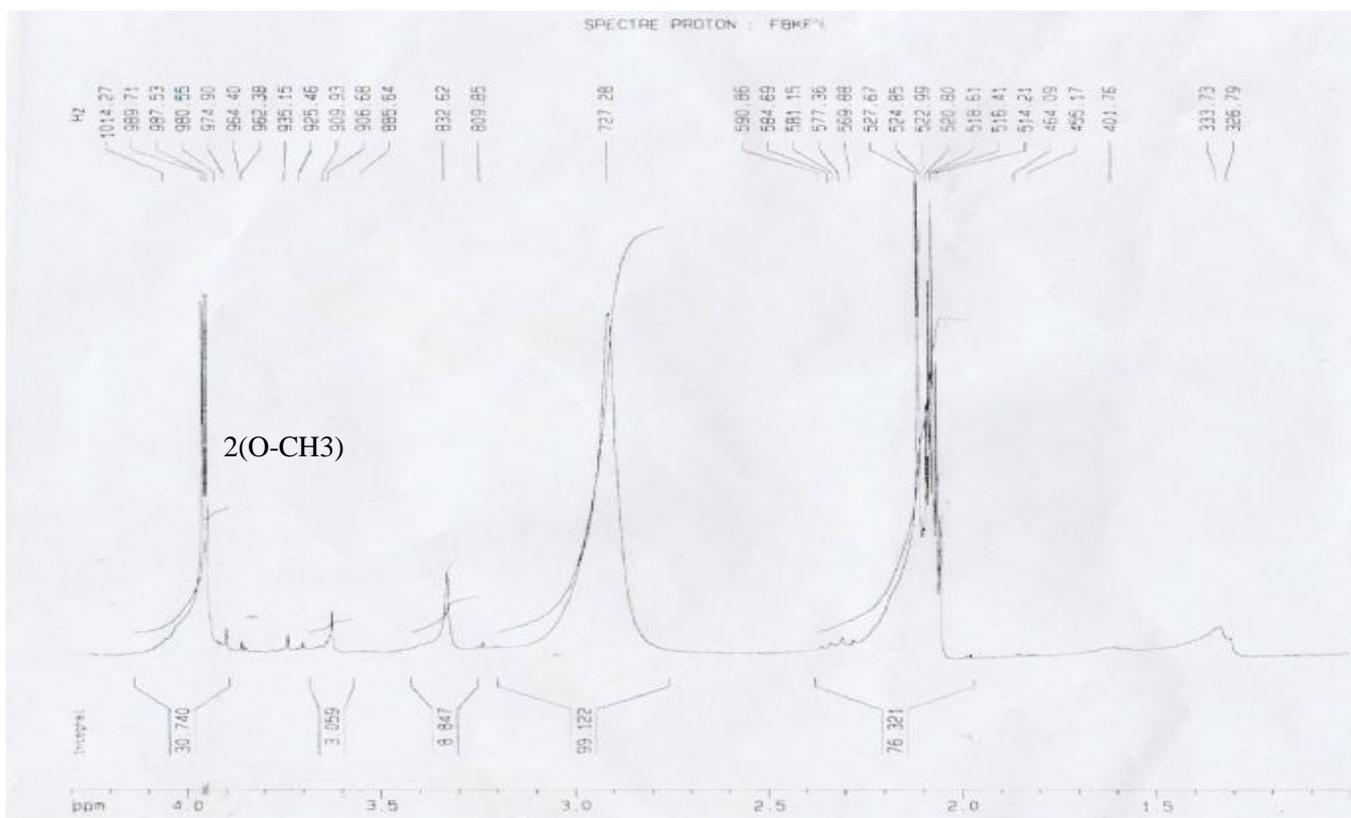
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,06 \text{ Hz}$), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,95 \text{ ppm}$ attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,85 \text{ ppm}$ ($J = 8,48 \text{ Hz}$, $J = 2,06 \text{ Hz}$) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7.05 \text{ ppm}$ ($J = 8,48 \text{ Hz}$), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6.75 \text{ ppm}$, le second à $\delta = 6.35 \text{ ppm}$ avec une constante de couplage $J = 2.20 \text{ Hz}$ (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement .
- Deux singulets d'intégration 3H chacun, le premier à $\delta = 3,94 \text{ ppm}$ et le second à $\delta = 3,95 \text{ ppm}$ attribuables à deux groupements méthoxyles .

Les données relatives à la RMN-¹H de ce composé sont reportées dans le tableau IV.4

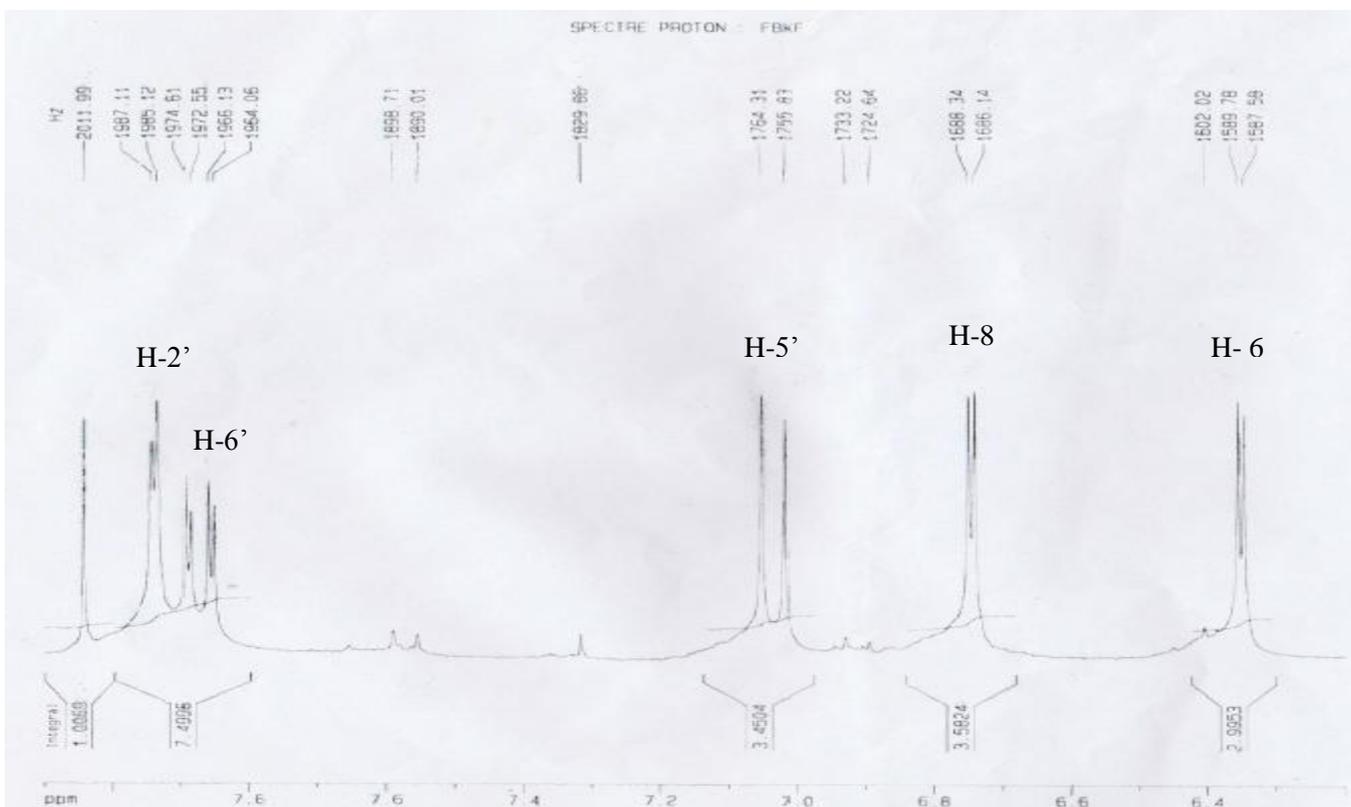
Tableau IV.4: Données de la spectrométrie RMN-¹H du composé F2

| Déplacement chimique δ (PPM) | Multiplicité (J HZ) | Intégration | Interprétation |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|------------------|
| 7.95 | d(2.06Hz) | 1H | H-2' |
| 7.85 | dd(8.47 ; 2.05Hz) | 1H | H-6' |
| 7.05 | d(8.48) | 1H | H-5' |
| 6.75 | d(2.20) | 1H | H-8 |
| 6.35 | d(2.20) | 1H | H-6 |
| 3.95 | s | 3H | OCH ₃ |
| 3.94 | s | 3H | OCH ₃ |

Spectre IV.2 : Spectre RMN-¹H (250 MHz, DMSO) du composé F2



Spectre IV.3 : Spectre RMN-¹H (250 MHz, DMSO) étalé (1-4 ppm) du composé F2



Spectre IV.4: Spectre RMN-¹H (250 MHz, DMSO) étalé (6.2-8 ppm) du composé F2

Les données de la RMN-¹H rassemblées avec celles de la série spectrale UV mènent à la structure suivante :

3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone ou bien 7,3'-diméthyl quercétine

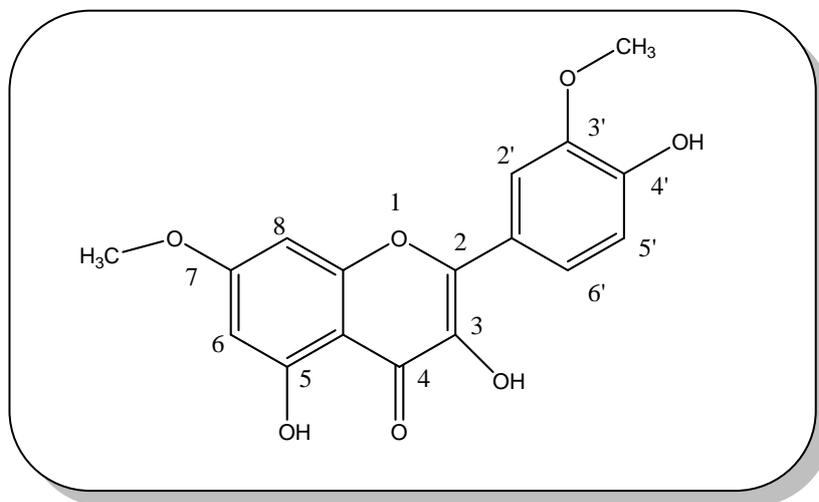
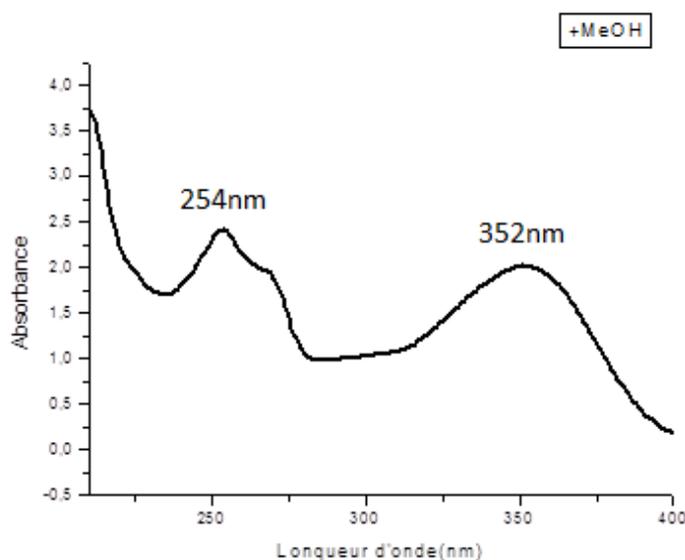


Figure IV.4 : La structure du **3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone**

IV.4. Identification de structure du composé F9 :

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol (spectre IV.5) montre deux bandes caractéristiques d'un flavonoïde, la bande I à $\lambda_{\text{max}} = 352 \text{ nm}$, est en faveur d'un flavonol substitué en position 3.



Spectre IV.5 : Absorption UV du composé F9

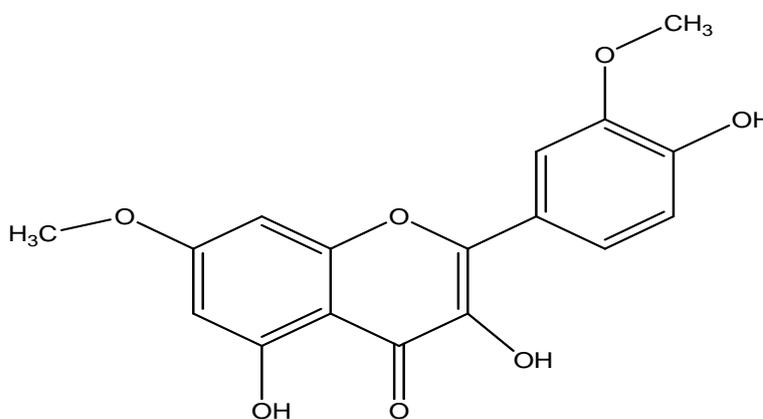
Conclusion

Le but de ce travail est l'isolement et l'identification structurale des métabolites secondaires de type flavonique de l'espèce *Limonium pruinosum*.L (plombagénacea), récoltée du Batna en 2015. L'étude bibliographique préalable réalisée sur cette espèce a montré qu'il n'existe pas beaucoup d'informations de nature chimique et/ou biologique.

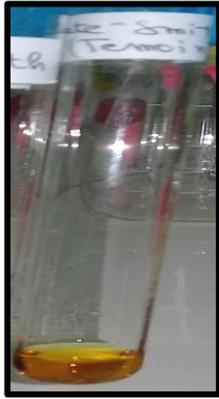
L'étude, que nous avons présentée dans ce mémoire, portée sur l'investigation phytochimique de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de l'espèce *Limonium pruinosum* L.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes et les tanins. Ces métabolites secondaires ont des grandes valeurs thérapeutiques, l'analyse qualitative de l'extrait butanolique par CCM suppose la présence probable des flavonoïdes de type flavonol, ces molécules sont considérées comme les composés antioxydants les plus actifs de la famille des flavonoïdes. L'estimation quantitative des polyphénols totaux dans les extraits analysés montre que l'extrait butanolique enregistre une richesse en polyphénol.

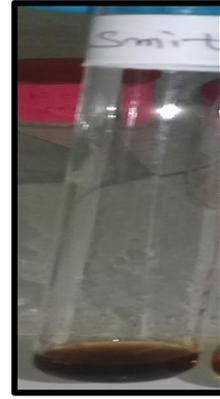
Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette espèce d'intérêt en se focalisant sur la phase *n*-butanol, et de faire le fractionnement, l'isolement et l'identification des flavonoïde, par l'utilisation des différentes méthodes chromatographiques, (chromatographie sur colonne et chromatographie sur couche mince), qui ont permis l'isolement et la purification de deux produits purs. Nous avons pu par des méthodes de spectroscopie de résonance magnétique (RMN-¹H) et de la spectrophotométrie (UV) d'établir la structure d'un seul produit pur qui est :



3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone



(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des flavonoïdes (test de Bath-Smith) type flavan3,4 diols chez *Limonium pruinosum* (1) : témoin négatif, (2) : extraits hydroalcoolique de la plante



(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des flavonoïdes (test de Wilstater) type flavonols et flavanones chez *Limonium pruinosum* (1) : témoin négatif, (2) : extraits hydroalcoolique de la plante



(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des tannins (test de Gélatine 1%) chez l'espèce *Limonium prinosum* (1) : témoin négatif, (2) : extraits hydroalcoolique de la plante



(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des tannins (test de FeCl_3) chez *Limonium pruinosum* (1) : témoin négatif, (2) : extraits hydroalcoolique de la plante



(1)

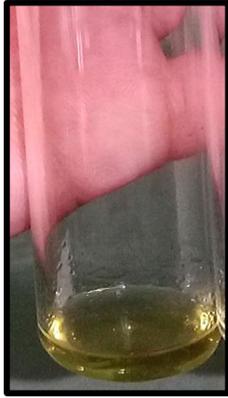


(2)

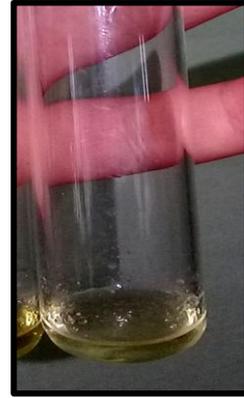
Résultats de screening phytochimique des quinones chez *Limonium pruinosum*. (1) : témoin négatif, (2) : extraits étherique de la plante



Résultats de screening phytochimique des coumarines

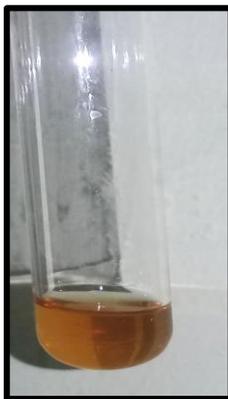


(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des anthraquinones chez *Limonium pruinosum* (1) : témoin négatif, (2) : extraits Chloroformique de la plante

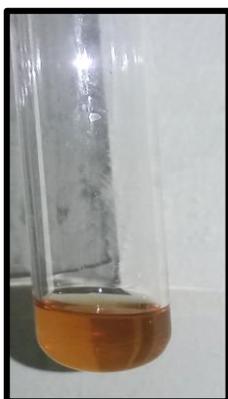


(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des alcaloïdes (test de Dragendorff) chez *Limonium pruinosum*.(1) : témoin négatif, (2) : extrait sulfurique de la plante



(1)



(2)

Résultats de screening phytochimique des alcaloïdes (test de Mayer) chez *Limonium pruinosum*.(1) : témoin négatif, (2) : extrait sulfurique de la plante



Résultats de screening phytochimique des saponosides chez l'espèce
Limonium pruinosum

- [1] Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, vol (161) : p 839-851.
- [2] Kalish D., (2014). Expression phytochimique des plantes (cas Fabaceae) face aux stress écologiques. Thème de Licence. University de Ouargla .
- [3] Smara N., (2014). Etude ethnobotanique et chimique d'Euphorbia guyoniana boiss Et Reut. Thèse de doctorat. Université d'Annaba.
- [4] Falleh Ksouri R., Chaieb K., Karray Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008) .Phenolic composition of Cynara, cardunculus L. Organs and their biological activities C. R. *Biologies* , vol (331) : p 372-379.
- [5] Korul Kina L M., Shul'ts E E., Zhusupova G E., Abilov Zh A., Erzhanov K B., Chaudri M I., (2004) . Biologically actives compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chemistry of Natural Compounds*, vol 40(5) : p 465- 471.
- [6] Ye G., Huang Ch., (2006). Flavonoids of *Limonium aureum*. *Chemistry of Natural Compounds* , vol 42(2) : p 232-234 .
- [7] <https://www.aujardin.info/plantes/famille-plumbaginaceae.php>
- [8] Botineau M., (2010) . Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs , vol (1), Ed Tec&Doc, Lavoisier, Paris : p 1336.
- [9] C:\Users\PC Store\Desktop\Limonium pruinosum\Cite internet\Les plantes de la famille des plumbaginacées - Compléments alimentaires.html
- [10] (www.plantesbotanique.org).
- [11] PC Store\Desktop\Limonium pruinosum\Flore de Crète (principalement), mais aussi parfois d'ailleurs_ les Plumbaginacées (Plumbaginaceae Juss.).html
- [12] http://www.herbierimages.be/index_fichiers/plumbaginaceae.html
- [13] Cheriti A., (2000). Rapport CRSTRA. Plantes médicinales de la région de Bechar sud-ouest Algérie . *Ethnopharmacological studies* , Bechar Alegria : p 3-11.
- [14] Hammami S., Nguir A., Dhouha S., Cheriaa J., Mighri Z., (2011) .Chemical analysis and antimicrobial effects of essential oil from *Limonium guyonianum* growing in Tunisia. *Medicinal Plants Research*, vol 5(12) : p 2540-2545.
- [15] Li H L., (1978). Plumbaginaceae Flora of Taiwan, Epoch Publishing Co. Ltd.Taipei .
- [16] Jiangsu., (1977). New Medicine College.Chinese Materia Medica Dictionary. *Science and Technology Press* , Shanghai.
- [17] Gupta M P., (1995). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas . *CYTED-SECAB* , Bogota Colombia : p 441-442.
- [18] Chevalier A., (1938). Utilisation du *Plumbago zeylanica* pour le traitement de la lèpre. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, vol 18 (200) : p 269-272 .
- [19] Boullard B., (2001). Plantes médicinales du monde : croyances et réalités. *ESTEM* : p 636.
- [20] Babula P., Vojtech A., Ladislav H., Rene K., (2009). Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones their Occurrence. Pharmacological Properties and Analysis. *Current*

Pharmaceutical Analysis, vol 5(1) : p 47-68.

[21] Miller P H., (1785) . *Dictionnaire des jardiniers* , vol (4), Paris : p 439.

[22] Saidana D., Mahjoub S., Boussaada O., Chriaa J., Mahjoub A ., Chéraif I., Daami M., Mighri Z., Helal A N., (2008). Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oils of Two Saltcedar Species from Tunisia . *J Am Oil Chem Soc* , vol (85) : p 817–826.

[23] Quezel P., Santa S.,(1963) .Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol (2) , Paris : p 732 .

[24] Strahm S., (2005). Le Top 50 des plantes menacées des îles méditerranéennes Bertrand de Montmollin. IUCN, 110.

[25] Quattrocchi U., (2012). CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants : Common Names ;Scientific Names ;Eponyms ; Synonyms ; and Etymology , vol (5) , CRC Press : p 3960.

[26] Aniya Y., Miyagi C., Nakandakari A., Kamiya S., Imaizumi N., Ichiba T., (2002). Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* , vol 9(3) : p 239-244 .

[27] Korul'kina L M., Zhusupova G E., Shul'ts E E., Erzhanov K B., (2004) . Fatty-acid composition of two *Limonium* plant species. *Chemistry of Natural Compounds*, vol 40(5) : p 417-419.

[28] Xinhui T., Jing G., Jin C., Lizhi X., Yahong T., Huan D., Wen Y., Xiaoning Z., (2007). Expression of VDAC Regulated by Extracts of *Limonium sinense* Ktze root Against CCl4-induced Liver Damage . *International Journal of Molecular Sciences* , vol 8(3) : p 204-213.

[29] Mahmoud T., Sanjay G., (2013). Eastern Desert of Egypt : a case study from Wadi El- Gemal National Park . *Medicinal Plants and Studies* , vol 1(6) : p 10-17.

[30] Medini F., Bourgou S., Lalancette K G., Snoussi M., Mkadmini K., Coté I., Abdelly C., Legault J., Ksouri R.,(2015).Phytochemical analysis ; antioxidant ; anti-inflammatory and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany* , vol (99) : p 158-164.

[31] Chandler R F., Freeman L., Hooper S N., (1979) . Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 1(1) : p 49-68.

[32] Burgess J G., Osinga R., Wijffels R H., Tramper J., (1999). Marine Bioprocess Engineering, vol (5) , *Elsevier science B V* : p 413.

[33] Lellau T F., Liebezeit G., (2003). Cytotoxic and Antitumor Activities of Ethanolic Extracts of Salt Marsh Plants from the Lower Saxonian Wadden Sea. *Pharmaceutica Biology*, vol 41(4) : p 293-300 .

[34] Domina G., (2011). Plumbaginaceae .in ; Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.

[35] Boudermine S., Malafronteb N., Mencherini T., Vassallo A., (2015). Phenolic compounds from *Limonium pruinosum*. *Natural Product Communications*, vol 10(2) : p 319-321.

[36] Hiermann A., (1993). Flavonoids of *Epilobium dodonaei* . *Fitoterapia* , vol (5) : p 471.

- [37] Markham K R., Ternai B., Stanley R., Geiger H., Mabry T J., (1978). Carbon-13 NMR studies of flavonoids III . Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, vol (34) : p 1389-1397.
- [38] Guo J., Yu D L., Xu L., Zhu M., Yang S L., (1998). Flavonol glycosides from *Lysimachia congestiflora*. *Phytochemistry* , vol (48) : p 1445-1447.
- [39] Kennouche S., Latreche A., Bicha S., Lassed S., Bentamene A., Boucheham R., Boubekri N., Creche J., Zama D., Benayache S., Benayache F., (2016). Phytochemical and Antioxidant Activity of *Limonium Pruinsum* (L.). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, vol 7(1) : p 1855-1859.
- [40] Trabelsi N., Oueslati S., Ksouri R., Nassra M., Marchal A., Krisa S., Abdelly C., Mérillon J M., Waffo-Téguo P., (2014). The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, vol(146) : p 466-471.
- [41] Liang Zhang., Ning Li., Zhi-Zhong Ma, and Peng-Fei Tu., (2011). Comparison of the Chemical Constituents of Aged Pu-erh Tea, Ripened Pu-erh Tea, and Other Teas Using HPLC-DAD-ESIMS. *J. Agric. Food Chem*, vol (59) : p 8754–8760.
- [42] Esmat A., Al-Abbasi F A., Algandaby M M., Moussa A Y., Labib R M., Ayoub N A., Abdel-Naim A B., (2012). Anti-inflammatory activity of *Pistaciakhinjukin* different experimental models : Isolation and characterization of its flavonoids and galloylated sugars. *Journal of Medicinal Food*, vol (15) : p 278-287.
- [43] Kennouche S., (2015). Etude phytochimique et biologique des espèces *Chrysanthemum segetum* L.(Asteraceae) et *Limonium pruinsum* (L.) Chaz. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri Constantine.
- [44] Marais J P J., Deavours B., Dixon R A ., Ferreira D., (2006). The Science of Flavonoids, Springer, Ed Grotewold , Ohio : p 1–46.
- [45] Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M R., Krishna D R., (2001). *Indian Journal of Pharmacology* , vol (33) : p 2-16.
- [46] Duval C., Duval R., (1978) . Dictionnaire de la Chimie et de ses Applications , Edition Tec & Doc Lavoisier , Paris
- [47] Cook. N C., Samman S., (1996). *Journal Nutr Biochem* , vol (7) : p 66-76.
- [48] W Erdman J., Balentine J D., Arab L., Beecher G., Dwyer J T., Folts J., Harnly., Hollman J P L., Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., (2005). Burrowes J., (2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, Washington . *Journal of Nutrition*, vol (137): p 718 -737.
- [49] Malešev D., Kuntić V., (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal ; flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society*, vol 72 (10) : p 921-939.
- [50] Bruneton J., (2009). Pharmacognosie ; Phytochimie ; plantes médicinales, Ed 4 , Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales , Paris : p 1292.

- [51] Morreel K., Goeminne G., Storme V., Sterck L., Ralph J., Coppieters W., Breyne P., Steenackers M., Georges M., Messens E., Boerjan W.,(2006). Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus* : a case study. *Plant journal*, vol (47) : p 37-224 .
- [52] Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., Nakayama T., (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles . *plant Journal*, vol (45) : p 43-133 .
- [53] Bruneton J., (1999). Les tanins , Editions médicales internationales ,Paris : p 369-404.
- [54] Harborne J B., (1994) . Phytochemical dictionary of the leguminosae, vol (1), Edition *Chapman and hall* , London : p 20-22.
- [55] Harborne J B., (1975). Flavonoids in phytochemistry, vol (2) , Edition Lawrence P L ., Litton Educational Publishing.
- [56] Heller W., Forkmann G., (1988). In the flavonoids advances in research since 1980, Edition Harborne J B., Chapman and Hall, London : p 399-425.
- [57] Linuma M., Mizuno M., (1989). *Phytochemistry* : p 28- 681.
- [58] Ebel J., Hahlbrock K ., (1982) . In the flavonoids advances in research , Edition Harborne J B., Mabry T J., Chapman and Hall, London : p 641-659.
- [59] Harbone J B., Williams C A., (1988). In the flavonoids advances in research since 1986, Edition Harborne J B, Chapman and Hall , London : p 303.
- [60] Bruneton J., (1996). Plante toxique ; végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, Edition Tec & Doc , Paris .
- [61] Rice Evans C A., Miller N J., Paganga G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.
- [62] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A A., Capasso F., (1999). Flavonoids ; old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci*.
- [63] Nakujima T., Manishi M I., Yamamoto K., Cyong J C K., (2001) . Inhibitory effects of Baicalein ; A Flavonoid in *Scutellaria* Root ; On Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts. *Planta Medica*.
- [64] Eibi G.,Wagner H., (1991). A new method for the in *Vivo* Screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE),Using the chromophore Labeled Substrate Dansyltriglycine. *Planta Medica*.
- [65] Kim H K., Jeon W K., Ko B S., (2001). Flavanone Gglycoside from *Citrus junos* and their Anti-influenza Virus Activity. *Planta Medica*
- [66] Elsohly H N., Joshi A S., Nimrod A C., Walker L A.,Clark A M.,(2001). AntifungalChalcones fom *Maclura tinctoria*. *Planta Medica*.
- [67] Shahat A A., Cos P., Bruyne T D.,Apers S., Hammouda F M., Ismail S I., Azzam S., Claeys M., Goovaerts E., Pieters L., Berghe D V.,Vlietinck A J.,(2002). Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica*.

- [68] Murakami N., Mostaqul H M., Tamura S., Itagak S.,Hori T.,(2001). A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium* (*Hydrangea macrophylla*) *Bioorg. Med Chem. Lett.*
- [69] Bruneton, J., (1999).Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Ed 3 , Lavoisier, Paris .
- [70] Ribereau-Gayou J B., (1968). The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo,Paris.
- [71] Mabry T J., Markham K R., Thomas M B., (1970). The systematic identification of flavonoids . Springer-Verlag New York, Heidelberg : p 254.
- [72] Markham K R., (1982). Technique of flavonoides identification , Academic Press , London.
- [73] Chaudhry P S.,Cabrera J., Juliani H R., Varma S D., (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids sulindac and indomethacin . *Biochem Pharmacol*, vol (32): p 1995-1998.
- [74] Seghiri R., Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre Centaurea : C. africana, C. nicaensis. Thèse de doctorat . Université Mentouri Constantine.
- [75] Harborne J B., (1966). In Comparative Phytochemistry, Edition T. W. Goodwin, Academic Press , London.
- [76] Voirin B., (1983).UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-méthoxyflavones with mono-4',di- 3',4' or tri-3',4',5'-substituted B rings. *Phytochemistry*,vol (10) : p 2107– 2145.
- [77] Markham K R., Mabry T J., (1968). *Phytochemistry*,vol (7) : p 1197.
- [78] Jurd L., Horowitz R., (1962). Spectral properties of flavonoid compounds; in the chemistry of flavonoid compounds, Edition T.A. Geissman, Pergamon Press, New York ,Oxford : p 107-2055.
- [79] Jurd L., Geissman T A., (1956). Absorption spectra of metal complexes of flavonoids compounds. *Journal of Organic Chemistry*, vol 21(12) : p 1395–1401.
- [80] Bacon J D., Mabry T J., and Mears J A., (1976). UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Revue Latinoam Quim* , vol (7) : p 83–86.
- [81] Markham K.R.,Geiger H., (1993).The Flavonoids Advances in research since 1986. Edition J. B. HARBORNE, Chapman & Hall, London.
- [82] Markham E R., Geiger H., (1994). H1 NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide ; In Flavonoids, Edition Harborne J B , Chapman and Hall , London .
- [83] Markham K.R., (1976), ¹³C NMR of flavonoids-II, Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron* , vol (32) : p 2607-2612.
- [84] Hamidi A., (2012). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*.. Mémoire de Magistère. Université Kasdi Merbah Ouargla.

[85] Bruneton J., (1993). Pharmacognosie ; phytochimie des plantes médicinales , Ed 2, Edition Tec & Doc ,Paris : p 914.

[86] Dohou N., Yamni K ., Gmiran ., Idrissi Hassani L M .,(2003) . Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine ; *Thymelaea lychroides* .*Acta Botanica Malacitana* , vol (29) : p 233-239.

[87] Bouzid W., (2009). Etude de l'activité Biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna jacq.* Mémoire de Magister. Université Elhadj Lakhder Batna.

[88] Rizk A M., (1986). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, vol 52 (2) : p 35-42.

[89] Chenni M.,(2010) . Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jasq.Mémoire de Magister . Université Essenia Oran.

[90] Boizot N., Carpenter J P., (2006) . Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra* : p 79-82.

[91] Singleton V L., Orthofer R., Lamuela-Raventós RM ., (1999) . Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in *Methods in enzymology*. Elsevier : p 152-178.

[92] Oyaizu, M., (1986) . Studies on products of browning reaction . *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, vol 44(6) : p 307-315.