

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master 2 en chimie  
Option : Chimie des produits naturels

**Thème**

**Etude phytochimique et l'évaluation de l'activité  
antioxydante d'une plante saharienne du genre  
*Pituranthos***

**Réalisé par : M<sup>elle</sup> KAIS Karima**

M<sup>me</sup> FERHAT Meriem

**Soutenu le : 13 / 07/ 2022**

**Devant le jury composé de :**

- |                               |       |                    |             |
|-------------------------------|-------|--------------------|-------------|
| • M <sup>me</sup> AISSAOUI. M | (MCB) | Université Blida 1 | Présidente  |
| • M <sup>f</sup> MEZRAG. A    | (MCB) | Université Blida 1 | Examinateur |
| • M <sup>me</sup> ESSEID. CH  | (MCB) | Université Blida 1 | Promotrice  |

**Promotion : 2021-2022**

# Remerciements

Au terme de ce travail, nous tiendrons à remercier Dieu tout puissant, de nous avoir guidés sur le chemin du savoir, et de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Au premier lieu, nous remercions notre promotrice *M<sup>me</sup> ESSEID. CH* qui nous a proposé ce thème, a eu la gentillesse et la patience durant notre encadrement, de mettre à notre disposition toutes ses connaissances précieuses, son savoir-faire, ainsi que tous les moyens nécessaires pour effectuer notre stage dans les meilleures conditions.

J'exprime ma profonde gratitude à *M<sup>me</sup> AISSAOUI* de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie vivement *M<sup>r</sup> MEZRAG* de bien vouloir accepter d'examiner ce modeste travail.

Des remerciements particuliers vont également à mon frangin *M<sup>r</sup> KAIS. H*

Et ma frangine *M<sup>me</sup> KAIS. CH* pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie.

Et enfin un grand merci à l'ensemble des enseignants du département de chimie qui ont contribué à notre formation durant nos années d'études, et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicaces

*Je dédie ce travail en signe de respect et de reconnaissance :*

*À mes très chers parents, qui ont toujours été à mes côtés, qui m'ont soutenu et encouragé. Sans leur amour, leur compréhension, leurs conseils et leur tolérance je n'aurai jamais pu atteindre mes objectifs.*

*À mes frères : Hichem et Djamel Eddine.*

*À mes très chères sœurs : Chahrazed, Manel et Amina.*

*À toute la famille KAIS et HADEF.*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*À tous mes amis de la promotion Chimie*

*À tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail en signe de respect et de reconnaissance :*

*À mes très chers parents, qui ont toujours été à mes côtés, qui m'ont soutenu et encouragé. Sans leur amour, leur compréhension, leurs conseils et leur tolérance je n'aurai jamais pu atteindre mes objectifs.*

*À mes frères : Abd el rahman et Ismail*

*À mes très chères sœurs : Asma et Roumaïssa*

*À toute la famille FERHAT et HADEF*

*À mon mari Mounir et sa famille BENDAHIIB*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*À tous mes amis de la promotion Chimie*

*À tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.*

# Sommaire

Introduction	1
Références bibliographiques	3

## *partie : Recherche bibliographique*

### *Chapitre I : La famille des Apiaceae et le genre Pituranthos*

I.1- La famille des Apiaceae	4
I.1.1- Introduction	4
I.1.2- Historique	4
I.1.3- Classification de la famille des Apiaceae	5
I.1.4- Description de la famille des Apiaceae	6
I.1.4.1- Généralités sur la famille des Apiaceae	6
I.1.4.2- Identification botanique	7
I.1.5- Morphologie	7
I.1.6- Distribution géographique	7
I.1.7- Utilisation	8
I.1.7.1- Intérêt économique	8
I.1.7.2- Utilisation en médecine traditionnelle	9
I.1.8- Caractéristiques chimiques des Apiaceae	9
I.1.8.1- Les métabolites primaires et secondaires	9
I.1.8.1.1- Composés du métabolisme primaire	9
I.1.8.1.2- Composés du métabolisme secondaire	10
I.1.9- Toxicité de la famille des Apiaceae	13
I.1.10- Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés de la famille Apiaceae	15
I.2- Le genre <i>Pituranthos</i>	16
I.2.1- Généralités	16
I.2.2- Usages traditionnels du genre <i>Pituranthos</i>	17
I.2.3- Toxicité	18

I.2.4- Composition chimique du genre <i>Pituranthos</i>	18
I.2.4.1- Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Pituranthos</i>	18
Références bibliographiques	22

## ***Chapitre II: Les métabolites secondaires et les coumarines***

II- Métabolites secondaires chez les végétaux	26
II.1- Principes généraux de classification des métabolites secondaires	26
II.2- Les coumarines	27
II.2.1- Introduction	27
II.2.2- Définition	27
II.2.3- Les coumarines dans le règne végétal	28
II.2.4- Diversité structurale des coumarines	28
II.2.4.1- Coumarines simples	28
II.2.4.2- Coumarines prénylées	28
II.2.4.3- Furanocoumarines (linéaires et angulaires)	29
II.2.4.4- Pyranocoumarines	31
II.2.4.5- Coumarines à l'état dimérique (bicoumarines)	31
II.2.4.6- Coumarines à l'état trimérique (tricoumarines)	32
II.2.5- Intérêt pharmacologique des coumarines	32
II.2.6- La toxicité des coumarines	33
II.2.7- Activités biologiques des coumarines	33
II.2.8- Propriétés physico-chimiques des coumarines	35
II.2.8.1- Fluorescence sous la lumière UV	35
II.2.8.2- Analyse structurale	35
Références bibliographiques	37

## ***partie : Matériel et méthodes***

### ***Chapitre III : L'étude phytochimique et biologique***

III- Etude phytochimique et biologique de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire	42
III.1- Etude bibliographique	42
III.2- Place dans la systématique	42

III.3- Description botanique	42
III.4- Répartition géographique	42
III.5- Matériels et méthodes utilisés pour l'étude phytochimique	43
III.6- Etude phytochimique de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire	44
III.6.1- Récolte du matériel végétal	44
III.6.2- Screening phytochimique (Travail personnel)	44
III.6.2.1- Recherche des alcaloïdes	44
III.6.2.2- Recherche des saponines (indice de mousse)	45
III.6.2.3- Recherche des terpènes et des stérols insaturés	45
III.6.2.4- Recherche des triterpènes	46
III.6.2.5- Recherche des quinones	47
III.6.2.6- Recherche des substances polyphénoliques	47
III.6.2.7- Recherche des coumarines	48
III.6.2.8- Recherche des flavonoïdes	49
III.6.2.9- Recherche des anthocyanes	49
III.6.2.10- Recherche des anthraquinones	50
III.6.3- Extraction de la plante	50
III.6.4- Séparation chromatographique	53
III.6.5- Etude des fractions sélectionnées (Travail personnel)	53
III.6.5.1- Etude de la fraction CF12	53
III.6.5.2- Etude de la fraction CF22	58
III.7- Etude biologique de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire	59
III.7.1- Activités biologiques	59
III.7.1.1- Activité antioxydant	61
Références bibliographiques	65

## *Chapitre IV : Résultats et discussion*

IV- Résultat et discussion	68
IV.1- Résultat du screening phytochimique	68
IV.2- Elucidation structurale des produits isolés	69
IV.2.1- Elucidation structurale du composé CF12-2 (C5)	69
IV.2.2- Elucidation structurale du composé CF22-1 (C12)	76
IV.3- Résultats des activités biologiques	84

IV.3.1- Activité antioxydante dès l'extrait	84
IV.3.1.1- Effet scavenger du radical DPPH <sup>*</sup>	84
IV.3.1.2- résultat de dosage des polyphénols TPC	86
Références bibliographiques	89
<b>Conclusion</b>	90

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b> : Plante des Apiaceae	6
<b>Figure I.2</b> : Répartition géographique mondiale des Apiaceae	7
<b>Figure I.3</b> : Formules chimiques de la khelline I- <u>1</u> , visnadine I- <u>2</u> et visnagine I- <u>3</u>	10
<b>Figure I.4</b> : Formules chimiques de l'anéthol I- <u>4</u> et de l'estragol I- <u>5</u>	11
<b>Figure I.5</b> : Formule chimique de la fenchone I- <u>6</u>	11
<b>Figure I.6</b> : Formule chimique de la carvone I- <u>7</u> et du limonène I- <u>8</u>	12
<b>Figure I.7</b> : Formule chimique de l'aldéhyde cuminique I- <u>9</u>	12
<b>Figure I.8</b> : Formule chimique de la thapsigargine I- <u>10</u>	13
<b>Figure I.9</b> : Formule chimique de la cicutoxine I- <u>11</u> et de l'oenanthotoxine I- <u>12</u>	14
<b>Figure I.10</b> : Formule chimique de la $\gamma$ -coniine I- <u>13</u> et de la $\gamma$ -conicéine I- <u>14</u>	14
<b>Figure I.11</b> : Structures des saponines triterpéniques de <i>Physospermum verticillatum</i>	15
<b>Figure I.12</b> : Structures des diterpènes isolées à partir de l'extrait méthanolique d' <i>Anisitone flexuosa</i>	16
<b>Figure II.1</b> : Structures chimiques de quelques coumarines simples	28
<b>Figure II.2</b> : Structure chimique de rutacultine II- <u>8</u>	29
<b>Figure II.3</b> : Structures chimiques de quelques furanocoumarines (linéaires et angulaires)	30
<b>Figure II.4</b> : Structures chimiques de l'athamantine II- <u>19</u> , la columbianadine II- <u>20</u> , la rutarétine II- <u>21</u> et la rutarine II- <u>22</u>	30
<b>Figure II.5</b> : Structures chimiques de la 2',3'-dihydro jatamansine II- <u>23</u> et l'anomaline II- <u>24</u>	31
<b>Figure II.6</b> : Structures chimiques de quelques bicoumarines	32
<b>Figure II.7</b> : Structures chimiques de quelques tricoumarines	32
<b>Figure III.1</b> : Photo de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire ssp. <i>abbreviatus</i> Maire	43
<b>Figure III.2</b> : Test de la mise en évidence des alcaloïdes	45
<b>Figure III.3</b> : Test de recherche des saponines	45
<b>Figure III.4</b> : test caractéristique des stérols et des terpènes	46
<b>Figure III.5</b> : Test de mise en évidence de la présence de triterpènes	47
<b>Figure III.6</b> : Test caractéristique des quinones	47
<b>Figure III.7</b> : Test de caractérisation des tanins galliques et catéchiques	48
<b>Figure III.8</b> : Test de caractérisation des coumarines	48

<b>Figure III.9 :</b> Test de caractérisation des flavonoïdes	49
<b>Figure III.10 :</b> Test de caractérisation des anthocyanes	49
<b>Figure III.11 :</b> Test de caractérisation des anthraquinones	50
<b>Figure III.12 :</b> protocole d'extraction de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire	52
<b>Figure III.13 :</b> Profil chromatographique de la CF12	53
<b>Figure III.14 :</b> Colonne chromatographique de la CF12	54
<b>Figure III.15 :</b> plaque cromatographique des tubes f10-f14 sous la lompe de WOOD (365nm)	55
<b>Figure III.16 :</b> Profil chromatographique de la sous-fraction F'2	55
<b>Figure III.17 :</b> Plaque CCM analytique du produit CF12-3 sous le lompe UV-vis à 365 nm	56
<b>Figure III.18 :</b> Plaque CCM analytique du produit CF12-2 sous la lumière de Wood	56
<b>Figure III.19 :</b> Plaque CCM analytique des produits CF12-2 et C5	57
<b>Figure III.20 :</b> Etapes suivies lors de l'étude de la fraction CF12	57
<b>Figure III.21 :</b> les cristaux jaunes du produit CF12-2	58
<b>Figure III.22 :</b> Plaque CCM analytique du produit CF22-1 sous lumière de Wood	58
<b>Figure III.23 :</b> Plaque CCM analytique des produits CF22-1 et C12	59
<b>Figure III.24:</b> Etapes suivies lors de l'étude de la fraction CF22	59
<b>Figure IV.1 :</b> Corrélations COSY observées pour la molécule CF12-2	71
<b>Figure IV.2 :</b> Interactions HSQC (flèche verte) et HMBC (flèche bleue) observées pour la molécule CF12-2	72
<b>Figure IV.3 :</b> Structure finale du composé CF12-2, xanthotoxol	76
<b>Figure IV.4 :</b> Structure plane du composé CF22-1, bykangelicine	82
<b>Figure IV.5 :</b> Courbes représentants le % d'inhibition du DPPH des extraits	84
<b>Figure IV.6 :</b> Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH de l'acide ascorbique en fonction de la concentration	85
<b>Figure IV.7 :</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique	86



## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Position de la famille Apiaceae dans les systèmes de classifications évolutives	6
<b>Tableau I.2</b> : Répartition mondiale des genres des Apiaceae	8
<b>Tableau II.1</b> : Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines	34
<b>Tableau III.1</b> : Masses et rendements des extraits	51
<b>Tableau III.2</b> : Regroupements des sous fractions issues de la colonne chromatographique de la fraction CF12	54
<b>Tableau IV.1</b> : Résultat du screening phytochimique sur les différents métabolites secondaires de <i>P. battandieri</i> Maire	68
<b>Tableau IV.2</b> : données des spectres RMN du composé CF12-2	76
<b>Tableau IV.3</b> : Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (125 MHz) et $^1\text{H}$ (500 MHz) du composé CF22-1 (MeOH)	83
<b>Tableau IV.4</b> : les valeurs d'IC50 pour l'activité antioxydante	85
<b>Tableau IV.5</b> : les valeurs d'absorbance des extraits	87
<b>Tableau IV.6</b> : Teneur en polyphénols totaux des parties aériennes	87

## Liste des abréviations

UV	Ultra-violet
CLHP	chromatographie en phase liquide à haute performance
SM	la spectrométrie de masse
IR	infra rouge
CPG	Chromatographie phase gazeuse
Glc	Glucose
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
$^1\text{H}$	Spectre du proton
$^{13}\text{C}$	Spectre de carbone 13
$\text{NH}_3$	Ammoniac
KOH	hydroxyde de potassium
Na OH	hydroxyde de sodium
$\text{NaOCH}_3$	méthanolate de sodium
$\text{AlCl}_3$	chlorure d'aluminium
Hz	hertz
ppm	parties par million
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
CCM	Chromatographie sur couche mince
$\text{H}_2\text{SO}_4$	acide sulfurique
MeOH	méthanol
EtOH	éthanol
$\text{H}_2\text{O}$	l'eau
$\text{FeCl}_3$	chlorure ferrique
HCl	acide chlorhydrique
NaOH	hydroxyde de sodium
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	sulfate de sodium anhydre
$\text{CHCl}_3$	chloroforme
AcOEt	acétate d'éthyle
$R_f$	facteur de rétention
ROS	reactive oxygen species (espèces réactive de l'oxygène)
$\text{IC}_{50}$	la concentration des antioxydants correspondant à 50% d'inhibition
MHz	million de hertz

## Liste des Spectres

<b>Spectre IV.1</b> : Données de la HR-ESI-MS (+) relatives du composé CF12-2	69
<b>Spectre IV.2-1</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ étalé (125 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	70
<b>Spectre IV.3-1</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	70
<b>Spectre IV. 3-2</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	71
<b>Spectre IV.4-1</b> : Spectre COSY étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	71
<b>Spectre IV.5-1</b> : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) de CF12-2	72
<b>Spectre IV.6-1</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	73
<b>Spectre IV.5-2</b> : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du produit CF12-2	73
<b>Spectre IV.6-2</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	74
<b>Spectre IV.6-3</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	75
<b>Spectre IV.2-2</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ étalé (125 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF12-2	75
<b>Spectre IV.7-1</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ étalé (125 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) de CF22-1	77
<b>Spectre IV.8</b> : Spectre DEPT $135^\circ$ étalé (125 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) de CF22-1	77
<b>Spectre IV.9-1</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1	78
<b>Spectre IV.10-1</b> : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1	78
<b>Spectre IV.11-1</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) de CF22-1	79
<b>Spectre IV.9-2</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) de CF22-1	79
<b>Spectre IV.11-2</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1	80
<b>Spectre IV.12</b> : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1	81
<b>Spectre IV.11-3</b> : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1	81

<b>Spectre IV.9-3</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOH- $d_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1 avec toutes les indications	82
<b>Spectre IV.7-2</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, MeOH- $d_4$ , $\delta$ ppm) du composé CF22-1 avec toutes les indications	83

## *Résumé*

Le présent travail a consisté en une étude phytochimique et biologique de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire, variété Algérienne de la famille des Apiacées endémique au Sahara algéro-marocain.

Dans le cadre de ce travail nous avons également effectué le screening phytochimique sur les parties aériennes de cette espèce pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. La séparation et la purification par la CC et la CCM, effectuées sur deux fractions issues du fractionnement de l'extrait  $\text{CHCl}_3$  sur une colonne de gel de silice normale a mené à l'obtention de trois molécules : dont deux coumarines de type furocoumarine et un autre composé non pas été identifier, Les structures ont été établies par la combinaison des méthodes spectroscopiques RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC).

Par ailleurs, une valorisation biologique par la recherche de l'activité antioxydante a été effectuée sur les extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, *n*-BuOH et les deux produits isolés des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. Cette étude a montré que cette espèce a une efficacité biologique.

**Mots clés :** *Pituranthos battandieri* Maire ; Apiaceae ; Coumarines ; Furocoumarines ; Screening phytochimique ; Activité antioxydante.

## *Abstract*

The present work consisted on a phytochemical and biological study of the species *Pituranthos battandieri* Maire, Algerian variety from the Apiaceae family, endemic to the Algerian and Moroccan Sahara.

In this study, we also, carried out the phytochemical screening of the aerial parts of the studied species to determine the nature of the secondary metabolites that it accumulates. The separation and the purification with the CC and CCM of two fractions resulting from the fractionation of the CHCl<sub>3</sub> soluble part of the aqueous-alcoholic extract of the aerial parts, led to three compounds, which were: a two coumarins of furocoumarin-type and another compound not identified. The structures were elucidated by the combination of spectroscopic methods: 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC).

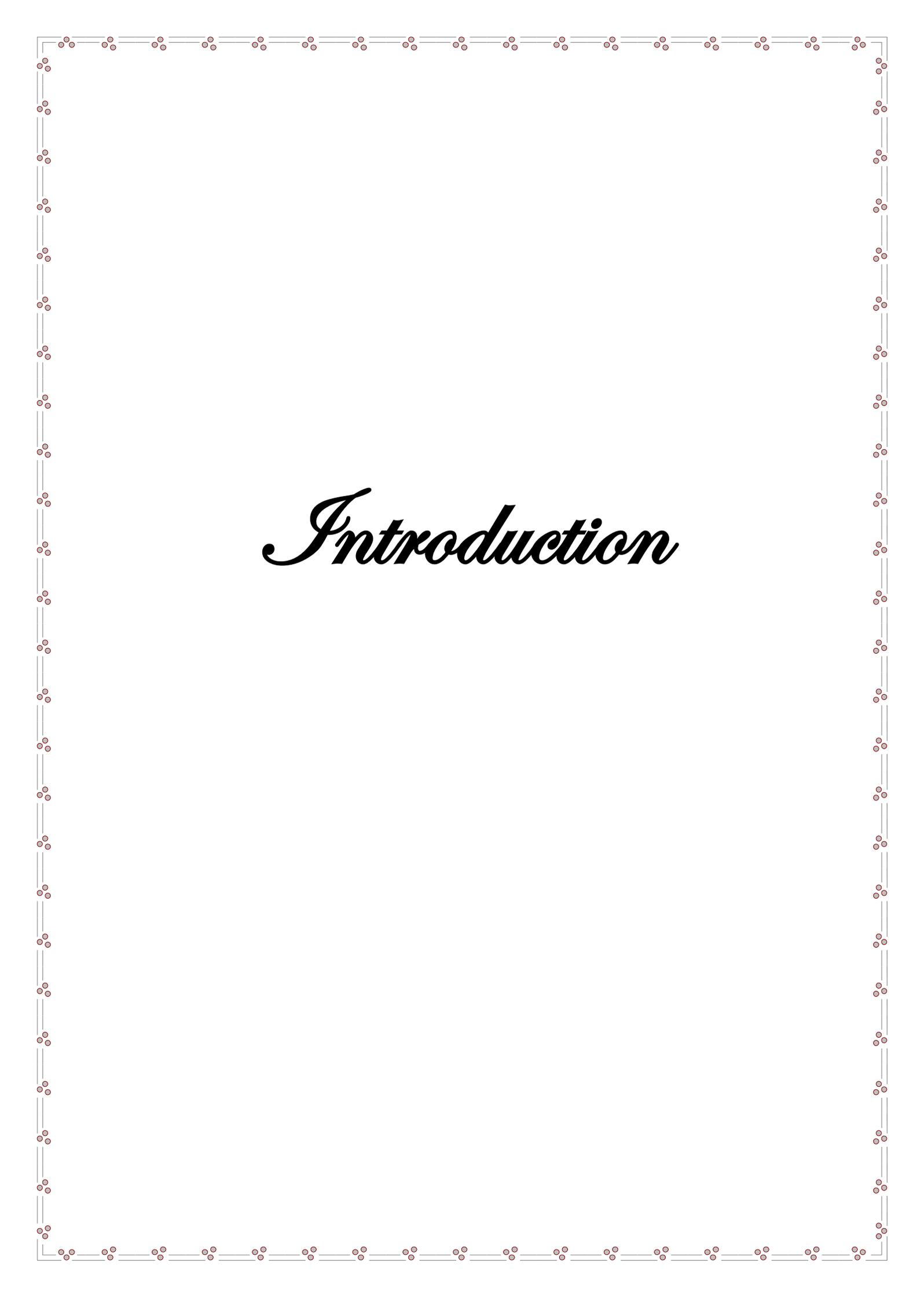
In addition, a biological valorization consisting in the evaluation of the antioxidant activity was carried out on the CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, *n*-BuOH extracts and tow isolated products of the aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire. This study showed that this species has a biological efficiency.

**Keywords:** *Pituranthos battandieri* Maire; Apiaceae; Coumarins; Furocoumarins; phytochemical screening; Antioxidant activity.

## الملخص

يتكون هذا العمل من دراسة كيميائية نباتية وبيولوجية لأنواع *Pituranthos patandieri* Maire ، وهي مجموعة جزائرية من عائلة *Apiaceae* مستوطنة في الصحراء الجزائرية المغربية. كجزء من هذا العمل ، أجرينا أيضًا فحصًا كيميائيًا نباتيًا على الأجزاء الهوائية من هذا النوع لتحديد طبيعة المستقبلات الثانوية التي تتراكم فيها. أدى الفصل والتنقية بواسطة *CC* و *TLC* ، الذي تم إجراؤه على جزئين ناتجين عن تجزئة مستخلص  $CHCl_3$  على عمود هلام السيليكا العادي ، إلى الحصول على ثلاثة جزيئات: بما في ذلك اثنين من الكومارين من نوع فوروكومارين ومركب آخر غير محدد ، تم إنشاء الهياكل من خلال الجمع بين طرق التحليل الطيفي *RMN 1D* ( $^1H, ^{13}C$ ), *RMN 2D* (*COSY* , *HSQC* , *HMBC*) بالإضافة إلى ذلك ، تم إجراء تثمين بيولوجي من خلال البحث عن نشاط مضادات الأكسدة على مستخلصات  $CHCl_3$  و *n-BuOH* و *AcOEt* والمنتجين المعزولين من الأجزاء الهوائية لبيتورانثوس باتانديري مير. أظهرت هذه الدراسة أن هذا النوع له فعالية بيولوجية.

**الكلمات المفتاح:** بيتورانثوس باتانديري مايور; *Apiaceae* ; الكومارين; فوروكومارين; الفحص الكيميائي النباتي; النشاط المضاد للأكسدة.



# *Introduction*



## Introduction générale

La phytothérapie ou l'art de soigner par les plantes est utilisée depuis la nuit des temps par les hommes ; les plantes constituant alors le seul remède pour traiter leurs maux. Voici un bref historique pour savoir comment la phytothérapie a traversé le temps [1, 2].

Le plus ancien recueil de formules végétales est gravé en caractères cunéiformes sur des tablettes d'argiles et a été découvert en 1984 dans les ruines de Nippur situé dans l'Irak actuel. Il date de l'époque sumérienne il y a plus de 5.000 ans (soit – 3.000 ans avant J-C). Le célèbre papyrus d'Ebers datant des civilisations pharaonique a été découvert à Louksor et cite plusieurs centaines de plantes médicinales. On pense qu'il date de moins 1.500 avant J-C [3].

Hippocrate (460-377 avant J-C), célèbre médecin grec, est considéré comme le père de la médecine. Il a consacré toute sa vie aux plantes médicinales, notamment à étudier leurs effets thérapeutiques. Auteur de la théorie des humeurs (comprenant le sang, la lymphe, la bile jaune et noire), Hippocrate souligne que si celles-ci n'atteignent pas un état d'équilibre, la maladie s'établit. Il laissera une somme considérable de données publiées en 280 avant J-C dans le Corpus Hippocraticum qui traite d'environ 250 simples [4].

Pline l'Ancien (23-79 après J-C) a recensé dans ses encyclopédies nommées « Histoire naturelle » environ 900 plantes connues à son époque tant du point de vue botanique que médicinal [5, 6].

Dioscoride (40-90 après J-C), médecin grec et successeur spirituel d'Hippocrate, a écrit le fameux « De materia medica » qui traite de 600 simples. Cet ouvrage a été la principale source de connaissance en matière de plantes médicinales durant l'Antiquité [7].

Un autre médecin grec, Claude Galien (131-201 après J-C), est considéré comme l'un des pères de la pharmacie. Il a codifié l'emploi de très nombreuses plantes médicinales et inventé pratiquement toutes les formulations magistrales ; on dira de lui qu'il est l'inventeur de la pharmacie galénique [8].

Charlemagne (742-814 après J-C) a promulgué les « capitulaires » qui sont des ordonnances royales notamment le De Villis indiquant les végétaux devant être plantés dans les domaines royaux. Le capitulaire De Villis comprend une liste de 94 plantes médicinales, aromatiques et alimentaires devant être cultivées dans les monastères. Parmi ces plantes, 73 sont des herbes dont font partie de la famille des Apiacées, l'aneth (*Anethum graveolens* L.),

l'anis (*Pimpinella anisum* L.), le carvi (*Carum carvi* L.), la coriandre (*Coriandrum sativum* L.), le cumin (*Cuminum cyminum* L.) et le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) [9].

Paracelse (1493-1541 après J-C), médecin et alchimiste suisse, est à l'origine de la théorie des signatures se basant sur l'analogie entre la morphologie de la plante médicinale et de l'organe à traiter. Il est aussi le précurseur de la toxicologie et de la pharmacologie. De lui vient cette célèbre citation : « tout est poison, rien n'est poison. La dose fait le poison » [10].

Cette étude s'intéresse à une famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence en forme d'ombelles et qui est aujourd'hui nommée Apiacées. Certaines plantes de cette famille sont en particulier utilisées lors de troubles digestifs de type dyspepsies, météorisme, ballonnements et douleurs intestinales [11, 12].

Dans ce mémoire nous nous sommes intéressés à l'étude d'une espèce endémique du genre *Pituranthos* et notre travail s'est déroulé selon quatre chapitres regroupés en deux parties :

Une première partie, bibliographique, comportant deux chapitres :

- Le premier chapitre sera consacré à une présentation botanique de la famille des Apiacées et du genre *Pituranthos* et ses métabolites secondaires.
- Le deuxième chapitre donne une vision sur les métabolites secondaires et précisément sur les coumarines, leurs définitions, et leurs classifications.

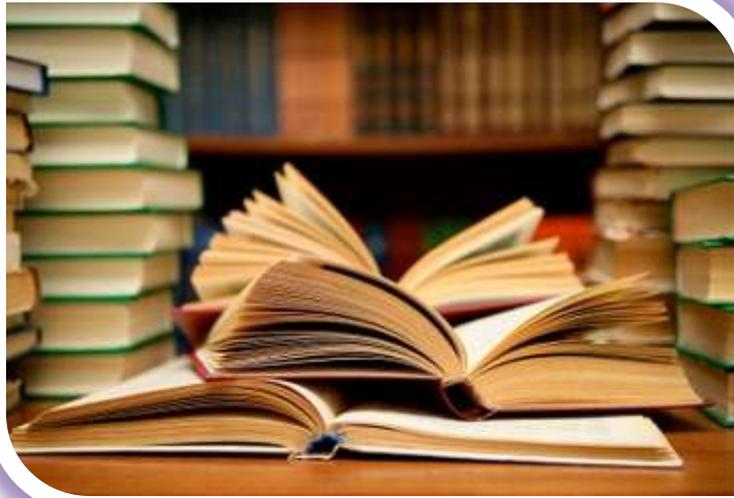
Une deuxième partie, expérimentale, comportant aussi deux chapitres :

- Le troisième chapitre renferme les tests préliminaires du screening phytochimique des parties aériennes de la plante que nous avons étudiée dans le cadre de ce travail, puis la séparation et la purification des différents produits de deux fractions de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de cette plante. Ainsi que l'activité antioxydant a été évaluée par le test du DPPH et par le test de Folin.
- Le quatrième chapitre comporte la détermination structurale des composés séparés et l'interprétation des résultats obtenus des tests de recherche de l'activité anti-oxydante.

Notre mémoire se termine par une conclusion générale.

## Références bibliographiques

- [1] Fauronr, Rouxd. La phytothérapie à l'officine (de la vitrine... au conseil), Du porphyre, Paris, 1989 ; 314 pp.
- [2] Lais E. L'ABC daire des plantes aromatiques et médicinales, Flammarion, Paris, 2001 ; 119 pp.
- [3] Anton R. Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinales, science et thérapeutique. 3éme édition, Technique documentation, Paris, 1999, p 22, 30.
- [4] Adams F, the Genuine Works of Hippocrates, New York, William Wood and Company, 1891.
- [5] Valérie N, Le projet encyclopédique de Pline l'Ancien, Rome, École française de Rome, 2002
- [6] Pline l'Ancien Stéphane S, Histoire naturelle, Gallimard, coll. La Pléiade, 2013.
- [7] Brunet F. « Les médecins grecs depuis la mort de Galien jusqu'à la fin de l'Empire d'Orient » in Laignel-lavastine, Histoire générale de la médecine, Paris, 1936. t.1, p. 433-463.
- [8] Bariéty M. Coury CH. Histoire de la Médecine. Librairie Arthème Fayard, 1963 ; 195-215.
- [9] Paris M, Hurabielle M. Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie). Tome 1 Masson, Paris 1981, p 1-3, 5-10.
- [10] Mazaheri A. Paracelse alchimiste. Notes critiques et positives. Annales. Économies, Sociétés, Civilisations. 1956 ; 11 : 183-193.
- [11] Hammiche V, Maiza K. Traditionalmedicine in Central Sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105(3) : 358-67.
- [12] Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. Fleurs du Sahara, Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili. Ibis Press, Paris. 2000.



# *Partie*

## *Recherche bibliographique*

**I.1- La famille des Apiaceae****I.1.1- Introduction**

Il est généralement estimé qu'il y a environ 300.000 espèces de plantes supérieures [1], cependant certains reportent le nombre à 250.000. D'autres estiment que le nombre est aussi élevé que 500.000, cette disparité du nombre est particulièrement liée à la différence de philosophie systématique chez les botanistes et la grande diversité des environnements et les forêts tropicales où on peut rencontrer des espèces nouvelles de plantes, continuellement. Parmi ces 300.000 espèces de plantes, environ 1% ; soit 3000 ont été utilisées comme nourriture, dont environ 150 ont été commercialement cultivées. D'autre part, à peu près 10.000 de ces plantes ont été documentées pour l'usage médicinal ; elles sont beaucoup plus que celles utilisées dans l'alimentation, mais le pourcentage par rapport au nombre des plantes supérieures est encore un très faible [2]. Ces espèces sont décrites et nommées suivant la nomenclature introduite en 1753 par Karl Von Linné, elles sont regroupées dans 300 familles différentes.

La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques [3], reste très peu explorée sur les plans phytochimique et pharmacologique. Dans ce qui suit, nous allons nous intéresser à la famille des Apiaceae.

**I.1.2- Historique**

Lors de l'apparition de l'homme, les Ombellifères (Apiaceae) sont déjà bien diversifiées et vraisemblablement très nombreuses. Alimentaires ou toxiques, elles ne manquent pas de se faire remarquer puis utiliser dès les premiers âges.

Elles figurent en effet parmi les premiers écrits de l'humanité. Lorsque le fameux manuscrit du linéaire B fut déchiffré en 1952 par Michael VENTIS et John CHADWICK, les chercheurs ont dû se rendre à l'évidence qu'il s'agissait d'un inventaire. Parmi les produits végétaux de cet antique dénombrement, trois Ombellifère puissamment aromatiques étaient citées : la coriandre (*Coriandrum sativum L.*), le cumin (*Cuminum cyminum L.*) et le fenouil (*Foeniculum vulgare Miller*).

Dans la flore pharaonique de Loret [4] en 1892, différents végétaux restes provenant des tombes égyptiennes ont été identifiés. Ainsi du céleri (*Apium graveolens L.*) a été retrouvé sous forme d'un collier constitué avec ses rameaux et des pétales de lotus bleu et un buplèvre

(*Bupleurum*) dans une brique funéraire. L'aneth (*Anethum graveolens* L.) était utilisé pour ses vertus médicinales. On y a également retrouvé les trois Ombellifères citées dans le linéaire B (coriandre, fenouil, cumin).

D'autres civilisations connaissaient et employaient également les Ombellifères. Ainsi les ouvrages médicaux chinois du 2<sup>ème</sup> et du 3<sup>ème</sup> siècle avant J-C. font état de neuf Ombellifères au moins. Quelques noms sanscrits désignent des Ombellifères et, avant l'arrivée des conquistadors au Mexique, les Indiens avaient déjà établi des classifications botaniques utilitaires comprenant également des Ombellifères.

### **I.1.3- Classification de la famille des Apiaceae**

Les plantes de la famille des Apiaceae appartiennent à l'embranchement des spermatophytes ou phanérogames car ce sont des plantes à graines. Les spermatophytes sont classées en deux catégories :

- les gymnospermes qui sont des plantes à ovules nus.
- les angiospermes qui par évolution ont des ovules protégés par des ovaires.

Parmi les angiospermes, on distingue les monocots et par évolution les eudicots suivant la structure de l'embryon contenu dans la graine. En effet, l'embryon des monocots ne contient qu'un seul cotylédon qui sert de réserve d'énergie alors que les eudicots en possèdent deux.

La classification APG pour *Angiosperms Phylogeny Group* est probablement la classification botanique la plus importante aujourd'hui [5,6]. Elle s'appuie sur des caractères phylogénétiques et permet la classification botanique des angiospermes. La version 2003 ci-dessous est une modification de la classification de 1998. D'après cette classification, on voit que la famille des Apiaceae est une des plus évoluées de la catégorie des angiospermes.

Pour résumer, on peut situer la famille des Apiaceae comme suit :

- Embranchement des spermatophytes (plantes à graine)
- Sous embranchement des angiospermes (plantes à ovaire)
- Eudicots (embryon à deux cotylédons)
- Eudicots évolués
- Classe des Astéridées
- Sous classe des euastéridées II
- Ordre des Apiales

➤ Famille des Apiaceae (ex-Ombellifères) (Tableau I.1)

**Tableau I.1 :** Position de la famille Apiaceae dans les systèmes de classifications évolutives

Auteur	Engler	Cronquist	Thorne	Dahlgren	Takhtajan	APG II
Super-classe						Tricolpées (Eudicotylédones)
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsidae				Tricolpées évoluées
Sous-classe	Archichlamydae	Rosidae	Magnoliidae	Cornidae		Asteridae
Super-ordre			Cornanae	Aralianae		Euastéridées II ou Campanulidées
Ordre	Umbelliflorae	Apiales	Araliales			Apiales
Famille	Umbelliferae	Apiaceae				

### I.1.4- Description de la famille des Apiaceae

#### I.1.4.1- Généralités sur la famille des Apiaceae

La famille des Apiacées (Apiaceae), appelées anciennement Ombellifères (Umbelliferae), est une famille de plantes dicotylédones. Selon Watson & Dallwitz, elle comprend environ 3000 espèces réparties en 469 genres distribués dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord [7]. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle (Figure I.1). Une seule espèce a une importance économique notable, la carotte, plusieurs fournissent des condiments appréciés, certaines sont toxiques comme la grande ciguë.



**Figure I.1 :** Plante des Apiaceae

### I.1.4.2- Identification botanique

Les Apiaceae sont généralement des plantes herbacées annuelles, parfois bisannuelles ou vivaces. La famille compte aussi des arbres et arbustes, comme le buplèvre. Cette importante famille est très mal représentée au Sahara, notamment dans sa partie centrale. En revanche, Les Ombellifères sahariennes sont différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile [8]. En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule [9].

### I.1.5- Morphologie

les Apiaceae sont, à quelques exceptions près, toutes herbacées, rarement ligneuses et arbustives, à plan floral fixe, annuelles, bisannuelles ou vivaces, à fleurs hermaphrodites, rarement dioïques ou polygames, disposées en ombelles, souvent munies à la base d'un verticille de bractées (involucre) ou composées de plusieurs ombelles simples (ombellules) presque toujours pourvues de bractéoles (involucelle) [10].

### I.1.6- Distribution géographique

La famille des Apiaceae est une famille cosmopolite, Elle est très commune en montagne mais toutefois assez rare dans les régions tropicales. Elle est présente dans tous les continents habités, mais surtout dans les régions tempérées, avec, toutefois, une prédilection pour l'hémisphère Nord (Figure I.2).

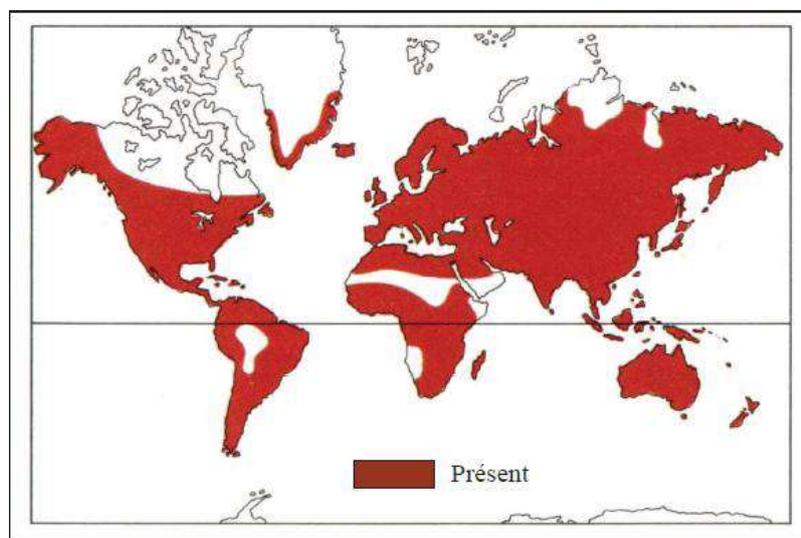


Figure I.2 : Répartition géographique mondiale des Apiaceae

Les genres se répartissent entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique (Tableau I.2) [11].

**Tableau I.2 :** Répartition mondiale des genres des Apiaceae

Continent	Genres	Endémiques
Afrique	126	50
Amérique	197	52
Asie	265	159
Australie	36	11
Europe	139	29

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces [4].

### I.1.7- Utilisation

La famille des Apiacées (Apiaceae), anciennement Ombellifères (Umbelliferae), regroupe de nombreuses espèces de plantes dont certaines sont comestibles (carotte, fenouil...) et d'autres sont toxiques (cigüe).

#### I.1.7.1- Intérêt économique

Les Apiaceae renferment de nombreuses plantes alimentaires et aromatiques [11] : *Anethum graveolens* L. (l'aneth), *Apium graveolens* L. (le céleri), *Carum carvi* L. (le carvi), *Coriandrum sativum* (le coriandre), *Cuminum cyminum* (le cumin), *Daucus carota* (la carotte), *Foeniculum vulgare* (le fenouil), *Pastinaca sativa* L. (le panais), *Petroselinum crispum* (le persil) et *Pimpinella anisum* L. (l'anis).

D'autres Apiaceae sont utilisées comme additifs naturels dans l'industrie alimentaire, certaines espèces sont comestibles, telles que : *Daucus carota* (carotte), *Pastinaca sativa* (panais), *Foeniculum vulgare*, etc.

Certaines espèces sont utilisées comme condiments ou épices, comme *Carum carvi* (cumin), *Anethum graveolens* (aneth), *Pimpinella anisum* (anis) *Petroselinum sativum* (persil), *Foeniculum vulgare* var. (fenouil) et *Coriandrum sativum* (coriandre).

D'autres sont utilisées comme arômes pour les boissons, tel est le cas d'*Angelica archangelica* (angélique), *Laserpitium gallicum* et plusieurs espèces d'*Heracleum* [12,13].

Certains genres sont cependant très toxiques, comme *Conium* (la grande ciguë, dont on dit qu'elle a été utilisée pour le suicide de Socrate), et *Cicuta* (la ciguë vireuse).

### **I.1.7.2- Utilisation en médecine traditionnelle**

Parmi les espèces anciennement utilisées en médecine traditionnelle on peut citer

*Ammi majus* : le fruit est utilisé dans le traitement du psoriasis et pour pigmenter les taches blanches apparaissant sur l'épiderme dans le vitiligo. Son action photosensibilisatrice est due à la présence de nombreuses furocoumarines dérivées du psoralène et dont l'une des plus connues est le bergaptène [14].

*Ammi visnaga* : les graines sont une source de khelline et de visnagine, furochromones à activités spasmolytiques et vasodilatatrices de la circulation coronarienne, et de flavonoïdes, diurétiques et emménagogues. Les pédicelles sont vendus comme cure-dents au Maghreb. Elle est utilisée en Irak comme source de colorant rouge [14].

*Anethum graveolens* (aneth) : propriétés analogues à celle de l'anis et du fenouil autrement dit antispasmodique digestif, eupeptique, carminatif et diurétique [15].

*Angelica archangelica* (angélique) : la racine contient une furocoumarine, l'angélicine qui possède une activité sédatrice. L'angélique doit à son essence ses propriétés stomachiques, eupeptiques et carminatives [14].

## **I.1.8- Caractéristiques chimiques des Apiaceae**

### **I.1.8.1- Les métabolites primaires et secondaires**

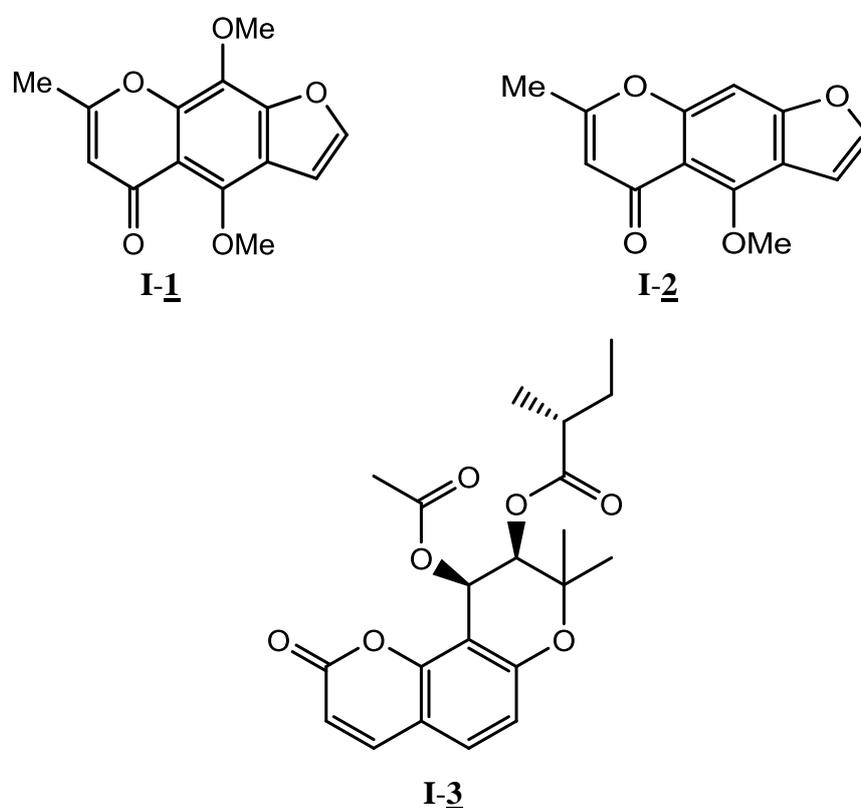
#### **I.1.8.1.1- Composés du métabolisme primaire**

Certaines plantes de la famille des Apiaceae peuvent être utilisées comme aliments. Les racines de la carotte (*Daucus carota* L.), du panais (*Pastinaca sativa* L.), du maceron (*Smyrniolus sativus* L.) et du céleri (*Apium graveolens* L.) peuvent être consommées ainsi que les feuilles de persil (*Petroselinum crispum* L.) et de céleri. Le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* L.) est utilisé en tant que condiment. Les souches et le pétiole d'angélique (*Angelica archangelica* L.) sont utilisés en confiserie (sous forme confite) car riches en glucides [16].

**I.1.8.1.2- Composés du métabolisme secondaire****A) Coumarines**

Les coumarines sont des molécules dérivées du phénylpropane, très répandues chez les Apiaceae. On rencontre majoritairement des furanocoumarines, linéaires ou angulaires, dont le noyau de base est le psoralène. Les coumarines simples sont moins répandues, de même que les pyranocoumarines, dont la forme linéaire est absente chez les Apiaceae [17].

Le khella (*Ammi visnaga* L.) contient des furanochromones dont la khelline **I-1** et la visnagine **I-2** ainsi que des pyranocoumarines dont la visnadine **I-3** (Figure I.3). La khelline est la chromonela plus active présentant des propriétés spasmolytiques. La visnadine a des propriétés antispasmodique et vasodilatatrice des coronaires [18].

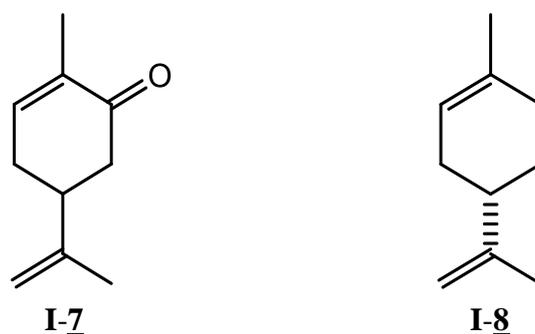


**Figure I.3 :** Formules chimiques de la khelline **I-1**, visnadine **I-2** et visnagine **I-3**

L'angélique officinale (*Angelica archangelica* L.) est un des constituants de l'eau de Mélisse des Carmes.

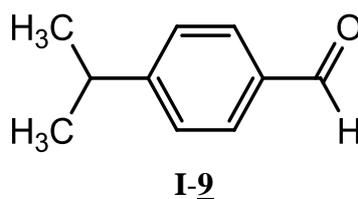


Les fruits de l'aneth (*Anethum graveolens* L.) renferment une huile essentielle riche en carvone **I-7** (50 à 60%) et en limonène **I-8** (Figure I.6) ayant des propriétés stomachiques, carminatives et diurétiques [19].



**Figure I.6 :** Formule chimique de la carvone **I-7** et du limonène **I-8**

Les fruits du cumin (*Cuminum cyminum* L.) renferment une huile essentielle riche en aldéhyde cuminique **I-9** (25 à 35%) (Figure I.7) [19].



**Figure I.7 :** Formule chimique de l'aldéhyde cuminique **I-9**

Les fruits de la coriandre (*Coriandrum sativum* L.) contiennent une huile essentielle ayant des propriétés stomachiques et carminatives. Cette plante entre dans la composition de l'eau de mélisse.

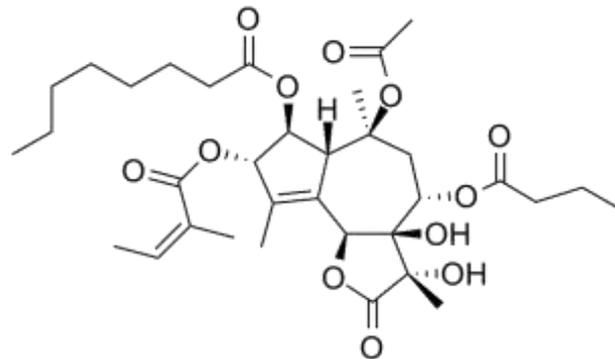
### C) Oléorésines

Les espèces du genre *Ferula* et surtout *Ferulagum mosa* Boiss, 1856 (= *Ferula galbaniflua*) sécrètent une substance par incision de la racine : le galbanum qui entre autre fois dans la composition de l'alcoolat de Fioraventi. On l'utilise aujourd'hui en parfumerie comme fixateur.

La *Ferula asa foetida* était employée comme antispasmodique, emménagogue et anthelminthique. Aujourd'hui, elle est employée en homéopathie. La gomme ammoniacque extraite de la *Dorema ammoniacum* D. Don, 1831 servait autre fois dans la confection d'emplâtres.

**D) Lactones sesquiterpéniques**

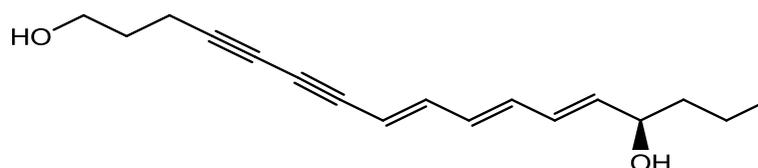
La *Thapsia garganica* est une plante africaine d'où l'on extrait la thapsigargine **I-10** (Figure I.8) de la racine, molécule ayant des propriétés vésicantes.

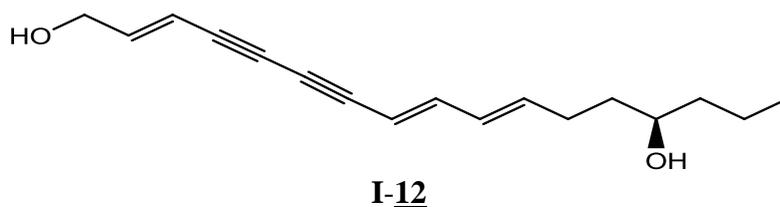
**I-10****Figure I.8** : Formule chimique de la thapsigargine **I-10****E) Saponosides**

*Bupleurum chinense* DC (= *Bupleurum falcatum* L.), connu pour sa richesse en saponosides, est utilisé en médecine traditionnelle chinoise comme antipyrétique et antigrippal [20].

**I.1.9- Toxicité de la famille des Apiaceae****A) Composés acétyléniques polyinsaturés : les polyynes**

La cigüe aquatique (*Cicuta virosa* L.) est une plante très toxique pouvant entraîner la mort par ingestion. En effet, toute la plante est toxique et renferme de la cicutoxine **I-11**. Les symptômes sont : salivation, vertige, brûlure de la bouche, vomissement, convulsion et arrêt respiratoire [16]. De même, l'œnanthe safranée (*Oenanthe crocata* L.) est aussi une plante très toxique pouvant entraîner la mort par ingestion. Toute la plante est toxique, elle renferme un isomère de la cicutoxine : l'œnanthotoxine **I-12** (Figure I.9). Les symptômes sont identiques à ceux lors de l'ingestion de la cigüe vireuse. Les racines d'œnanthe safranée peuvent être confondues avec les racines de céleri, navet et radis. Les feuilles quant à elles peuvent être confondues avec le persil.

**I-11**

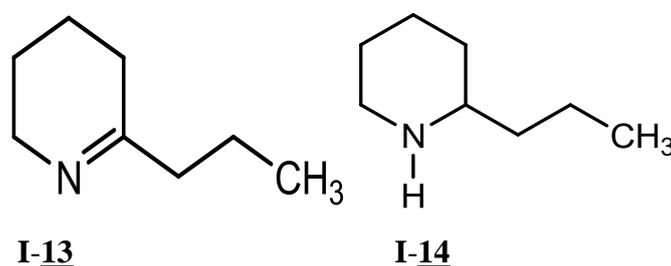


**Figure I.9 :** Formule chimique de la cicutoxine **I-11** et de l'oenanthotoxine **I-12**

La petite cigüe (*Aethusa cynapium* L.) est moins toxique que les deux premières. Les racines renferment des polyynes.

### B) Alcaloïdes

La grande cigüe (*Conium maculatum* L.) est une plante extrêmement toxique. Elle contient des alcaloïdes dérivés de la pipéridine. Les fruits sont riches en  $\gamma$ -coniine **I-13** tandis que l'appareil végétatif est riche en  $\gamma$ -conicéine **I-14** (Figure I.10). Les symptômes liés à l'intoxication sont : éblouissement, mydriase, vertige, soif intense, sensation de refroidissement progressif, baisse de la sensibilité et de la motilité, paralysie du diaphragme provoquant l'arrêt respiratoire. La grande cigüe peut être confondue avec la carotte sauvage ou le persil.



**Figure I.10 :** Formule chimique de la  $\gamma$ -coniine **I-13** et de la  $\gamma$ -conicéine **I-14**

### C) Coumarines

La fêrulle (*Ferula* sp.) est surtout toxique pour le bétail. Elle contient des gommes et résines d'hydroxy coumarines ayant des propriétés anticoagulantes provoquant des diarrhées hémorragiques, des hématuries et des dyspnées pouvant conduire au décès.

### D) Furanocoumarines

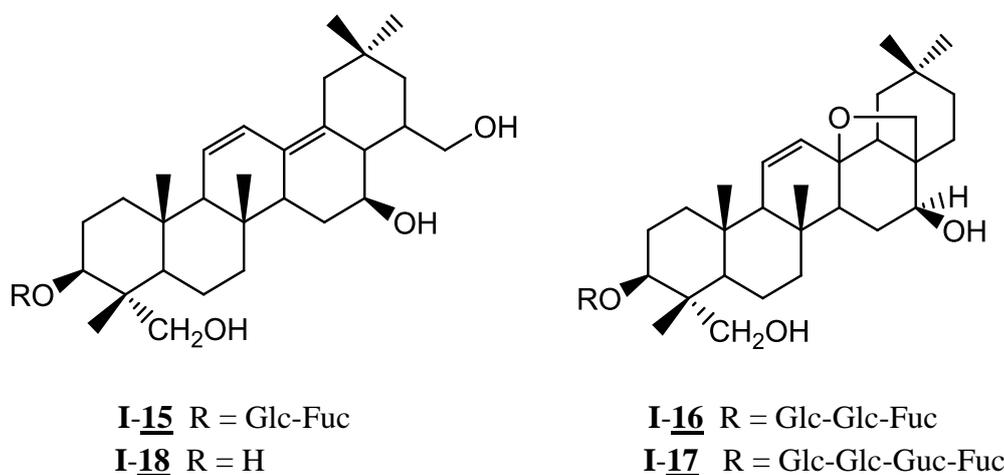
De nombreuses plantes alimentaires de la famille des Apiaceae comme l'angélique (*Angelica archangelica* L.), le céleri (*Apium graveolens* L.), le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le persil (*Petroselinum crispum* L.), la livèche (*Levisticum officinale* L.), la grande berce (*Heracleum sphondylium* L.), le panais (*Pastinaca sativa* L.) ainsi que la fêrulle (*Ferula* sp.) contiennent des furanocoumarines telles que le psoralène, le bergaptène et la

xanthotoxine qui sont des agents photosensibilisants pouvant entraîner une phototoxicité après exposition solaire. Ces plantes peuvent déclencher une dermatite des prés s'il y a contact avec la plante puis exposition aux ultraviolets (UV). Celle-ci est favorisée par l'humidité de la peau. Les symptômes sont de type érythème, brûlures, bulles, vésicules et peuvent être accompagnés de maux de tête voire de fièvre. Elles peuvent aussi entraîner une Phytodermatose alimentaire lorsque la plante est ingérée et qu'il y a ensuite exposition solaire. Dans de nombreux cas, s'ensuit une hyperpigmentation de la peau qui peut persister longtemps [21].

### I.1.10- Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés de la famille Apiaceae

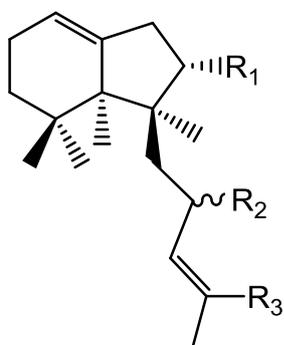
Des extraits éthanoliques de 23 espèces de la famille Apiaceae ont été analysés pour évaluer leur contenu en flavonoïdes et en isoflavonoïdes par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). En premier lieu, par la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) et en second lieu, par la CLHP semi-préparative avec des dosages immuno-enzymatiques (ELISA-HPLC). La rutine, la quercétine-3-glucoside et l'apigénine ont été les flavonoïdes les plus abondants. La génistéine, la sissotrine et la formononetine sont les isoflavones identifiées [22].

Trois saponines triterpéniques isolées à partir des racines de *Physospermum verticillatum* : saikosaponine **I-15**, buddlejasaponine IV **I-16**, et songarosaponine D **I-17** ont été étudiées *in vitro* pour leur activité cytotoxique contre des différents types cellulaires cancéreux. L'hydrolyse de l'unité sucre a été effectuée sur la saikosaponine afin d'obtenir une saikosapogénine **I-18** (Figure I.11). Toutes les saponines isolées présentaient une forte activité cytotoxique [23].



**Figure I.11** : Structures des saponines triterpéniques de *Physospermum verticillatum*

Trois diterpènes : l'acide anisotomenoïque **I-19**, l'anisotomene-1-ol **I-20** et l'acide 16-acétoxy anisotomenoïque **I-21** (Figure I.12) ont été identifiés et quantifiés dans les extraits méthanoliques obtenus à partir d'*Anisitone flexuosa* [24].



**I-19**  $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_3$

**I-20**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_3$

**I-21**  $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

**Figure I.12** : Structures des diterpènes isolées à partir de l'extrait méthanolique d'*Anisitone flexuosa*

## I.2- Le genre *Pituranthos*

### I.2.1- Généralités

Le genre *Pituranthos* possède plus de 20 espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord [25-27], et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

Le potentiel floristique Algérien de ce genre (nommé « Guezzah ») comporte quatre espèces endémiques : *P. reboudii*, *P. scoparius*, *P. battandieri* et *P. chloranthus*.

- ***Pituranthos reboudii*** (Cosset Dur) Benth et Hook : Tiges longues de 10-20 cm. Souche ligneuse ramifiée émettant de nombreuses rosettes de feuilles 1-2 fois triséquées, longues de 1-3 cm. Feuilles caulinaires supérieures linéaires. Ombelles terminales et latérales courtement pédonculées, larges de 2-3 cm à 2-7 rayons, se localise dans les pâturages arides [25].
- ***Pituranthos scoparius*** (Coss et Dur) Benth et Hook : Appelé aussi *Deverra scoparia* Coss. & Dur (nom arabe : guezzah) est une espèce endémique d'Afrique du nord et est très répandue en Algérie, surtout dans les hauts plateaux et dans la majeure partie du Sahara (pâturages arides rocailleux) difficile à distinguer de l'espèce *P. chloranthus*, *P. scoparius* est une plante vivace, aphyllé ; les feuilles supérieures sont réduites à leur gaine, les tiges sont dressées, de 40 à 80 cm de haut, formant des touffes denses qui

envoient latéralement de courts rameaux rigides, avec des fleurs blanches et des petits fruits [25].

- *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook : Espèce particulièrement peu présente. Maire avec trois sous-espèces [25] :
  - ssp. *cossonianus* Maire : Fruits de 1-1,5 mm, tiges florifères très ramifiées.
  - ssp. *Robustus* Maire : Ombelles à pédoncules robustes, longues de 2-5 cm ; fruits de 2mm, tiges ramifiées seulement dans le haut.
  - ssp. *Intermedius* Maire : Ombelles à pédoncules grêles et bien plus allongés.
- *Pituranthos battandieri* : Endémique au Sahara marocain et l'oranie [28]. Feuilles basales toujours persistantes sous les tiges. Tiges grêles à ramification plus ou moins étalées, développées et persistantes 1-3 séchées. Plante d'un vert glauque. Stigmates pourpres. Se localise dans les rocailles, pâturages désertiques. Maire avec deux sous espèces [25] :
  - ssp. *abreviatus* Maire ;
  - ssp. *leptactis* Maire.

Quezel [25] a décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, a tiges très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles est des percarpes ovoïdes à 6 bandelettes.

### I.2.2- Usages traditionnels du genre *Pituranthos*

Le genre *Pituranthos* (*Deverra*) est très utilisé en pharmacopée traditionnelle dans de nombreuses régions et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été validées par les tests appropriés [28-31].

L'espèce *Pituranthos Chloranthus* est employée, en cataplasmes sur la tête, contre les céphalées [32].

L'espèce *triradiatus* et *tartuosus*, sont utilisées par la population bédouine contre les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux ou comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes [32].

Les huiles obtenues des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre [33].

**I.2.3- Toxicité**

Les nomades connaissent le haut pouvoir allergisant des plantes du genre *Pituranthos* pour les animaux, en période de leur floraison [32].

En effet, le pollen des espèces *Chluranthos* et *scoparius* engendrent des ophtalmies graves, quand il pénètre dans les yeux des animaux. Le dromadaire en particulier y est très sensible. Très allergisant, ce pollen rend les animaux aveugles pendant plusieurs jours. Les nomades traitent ces ophtalmies en instillant dans les yeux du dromadaire, du jus de tabac ou en introduisant du sel sous les paupières [32].

**I.2.4- Composition chimique du genre *Pituranthos***

Les plantes du genre *Pituranthos* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Elles ont permis l'identification d'un nombre important de métabolites secondaires validés par des tests biologiques *in vivo* et *in vitro* [34,35].

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Pituranthos* d'après des données bibliographiques, concernent les espèces suivantes : *Chluranthos*, *scoparius*, *tortuosus*, *battandieri* et *triradiatus* [32, 33, 36, 37].

**I.2.4.1- Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Pituranthos***

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur les espèces du genre *Pituranthos*, nous a permis de constater que ces plantes sont peu étudiées et que leur composition chimique reste à déterminer.

L'étude effectuée [38] sur l'espèce *Pituranthos tortuosus* a permis d'isolés un flavonoïde glucoside nouveau et quatre composés flavoniques connus. Ces composés sont : isorhamnetine, chrysoériol, isorhamnetine 3-O-glucoside, et isorhamnetine 3-O-rutinoside.

Diverses fractions de l'extrait de cette plante, de même que les composés isolés, ont fait l'objet de tests biologiques relatifs à l'activité anti-tumorale.

Sept composés ont été isolés à partir des racines de *Pituranthos tortuosus* ; il s'agit des furocoumarines (bergaptène, graveolone, xanthotoxine, isopimpinelline, aesculetin l'éther

diméthylque, le stigmastérol glucoside) en plus d'un ester (4-méthoxyphénylumbellate). Les composés isolés ont été identifiés par différentes techniques spectroscopiques [39].

Une autre étude récente sur l'espèce *tortuosus* a été réalisée [40] sur les parties aériennes. Cette étude a permis d'extraire de l'huiles essentiels ou les composés majoritaires de cette huile étaient le sabinène (11 %), le limonène (10,9 %), le p-cymène (7,0 %), le  $\alpha$ pinène (5,5%) et le myrténol (26,2 %) au mois de novembre devant 39,6% de terpinèn-4-ol au mois d'avril. Des essais antimicrobiens ont montré que l'huile essentielle au mois de novembre est plus efficace que celle obtenu au mois d'avril contre les bactéries Gram-positives *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. Ces composés ont été analysés par CG et CG-MS [40].

L'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pituranthos tortuosus* Benth et crochet (Egypte) a été faite par plusieurs techniques. Il s'agit de l'hydrodistillation classique (HD), l'hydrodistillation simultanée-extraction par solvant (n-pentane) (DE) et une extraction classique par solvant volatil (SE). Les rendements obtenus sont respectivement de 0,8 %, 0,6 % et 1,5 % (p/v). L'analyse par GC-MS a montré que les principaux composants de l'huile obtenue par HD étaient le  $\beta$ -myrcène (18,81 %), le sabinène (18,49 %), le trans-iso- $\epsilon$ lemicine (12,9 %) et le terpinèn-4-ol (8,09 %) par contre le terpinèn-4-ol (29,65 %), le sabinène (7,38 %), le  $\gamma$ -terpinène (7,27 %), et le  $\beta$ -myrcène (5,53 %) sont les composés majoritaires de l'huile obtenue par DE. La composition de l'huile SE est caractérisée par la présence du terpinèn-4-ol (15,40 %), l'anethapiol (7,90 %), et allo-ocimène (6 %). L'huile obtenue dans chaque cas, a été testée pour son activité cytotoxique sur les trois lignées cellulaires de cancer humain, du foie (HEPG2), du côlon (HCT116) et du sein (MCF7). L'échantillon DE a montré l'activité la plus puissante contre les trois lignées cellulaires testées [41].

Une étude chimique sur les jeunes pousses du *Pituranthos triradiatus*, a été réalisée par Halim A.F et al, [42]. Celle-ci a abouti à l'isolement et l'identification de deux monoterpoides coumariniques nouveaux : (-)-S-trans-marmine et pituranthoside [(-)-S-trans-marmine-7'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside] ainsi que quatre coumarines connues : xanthotoxol, isopimpinelline, bergaptène et umbelliférone.

Une étude récente a été effectuée sur les racines de l'espèce *Pituranthos scoparius* [43]. Cette étude a permis d'isoler deux nouveaux composés isocoumariniques : hydroxy-6-

methoxy-5-propyl-3-isocoumarine et dimethoxy-5,7-hydroxy-6-propyl-3-isocoumarine et un acide gras : l'acide oléique.

Cinq flavonoïdes ont été isolés à partir de l'extrait butanolique de *Pituranthos scoparius* de la région de Ghardaïa. L'apigénine-7-O-glycoside (apigetrine), l'apigénine-7-O-rhamnoside, l'isorhamnetine-3-O-rutinoside, l'isorhamnetine-3-O-glycoside et l'apigénine-6,8-di C-glycoside (vecinin -2). Cet extrait a donné une forte inhibition des germes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition de 30 mm de diamètre [44].

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des parties aériennes de *Pituranthos scoparius* récoltée de différentes régions d'Algérie ont été analysés par GC et GC-MS. Elles ont révélé la présence d'hydrocarbures monoterpéniques et certains composés oxygénés. Les composants principaux sont l' $\alpha$ -pinène (4,4 à 35,8 %), le limonène (0,8 à 66,5 %), l'acétate de bornyle (tr-9,6 %), myristicine (tr-31,1 %) et l'aneth apiole (0,4 à 47,3 %). Les parties aériennes de *P. scoparius* pourraient être soit très riche ou très pauvre en limonène, myristicine ou aneth apiole [45].

Par ailleurs, les huiles essentielles obtenues par distillation des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* ont été analysées par CG-MS [46-48]. L'analyse a permis d'identifier approximativement 94 composés [46].

La recherche bibliographique relative aux études chimiques de l'espèce *chloranthus* montrent que quatre flavonoïdes glucosidique ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos chloranthus* collecté dans la région d'El Hoggar, de l'extrait *n*-butanolique [49]. Les composés isolés sont : l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, l'isorhamnétine-3-O-glucoside, l'apigénine-6,8-di-glucoside (vicenine-2) et la tamarixetine-3-O-glucoside.

L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. chloranthus* a montré que les principaux composants de l'huile obtenue étaient de classe de monoterpènes, alors que les sesquiterpènes étaient moins importante dans la plupart des populations analysées [50]. D'autres composants non-terpéniques ont été identifiés dans cette huile telle que des alcanes, des alcools et des aldéhydes. D'après Neffati [51], les huiles essentielles de trois populations de *P. chloranthus* démontrent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*; attribuée à la présence du linalol, camphre, cymène et spathuléol dans cette huile.

Une étude chimique a été effectuée sur les parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire par E.C [36, 52]. Cette étude a permis d'isoler 23 composés naturels dont treize de type coumarine (xanthotoxine ; phellopterine ; xanthotoxol ; R-(+)-marmine ; rutaretine ; (R)-(+)-héraclénine ; R-(+)-byakangelicol ; R-(+)-byakangelicine ; 8-[(R)-6',7'-dihydroxygeranyloxy] psoralène ; (R)-8-hydroxyaegelinol) parmi lesquels 3 sont nouveaux (la (R)-pituranthosine A, la (R, S)-pituranthosine B, et la pituranthosine C, Il s'agit de 4 flavonoïdes (l'isorhamnetine, l'apigénine, la biochanine A et la cacticine), 2 stéroïdes (un mélange de  $\beta$ -sitostérol et stigmastérol (50-50%) et l'autre de daucostérol et stigmastérol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside (72-28%)), 3 composés phénoliques (La vanilline, l'acide vanillique et la  $\beta$ -hydroxy propiovanillone) et 1 sucre réduit (le mannitol). Les structures ont été identifiées par les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques (RMN<sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) et la spectrométrie de masse [36, 52].

Une autre étude récente a été réalisée sur les parties aériennes de cette espèce par les mêmes chercheurs E.C. Cette étude a analysée l'extraire de l'huile essentielle par GC et GC-MS [37]. Elle révèle la présence de 64 composés représentant 94,7% de la composition globale de l'huile essentielle de cette espèce. Le myrcène (8,9%), le  $\alpha$ -phéllandrène (17,5%), le  $\alpha$ -terpinène (14%), l'o-cymène (11,6%), le  $\beta$ -phéllandrène (3,5%), l'oxyde de cis-linalol (furanoïde) (5,9%) et le *trans*- $\beta$ -caryophyllène (3,4%) sont les composants majoritaires de cette huile essentielle. La composition chimique de cette l'huile est décrite pour la première fois.

## **Conclusion**

Les Apiaceae sont l'une des familles les plus connues parmi les plantes à fleurs. Ils ont été largement étudiées, en raison notamment de leur importance économique, Ils sont aussi largement utilisées en médecine traditionnelle pour certaines propriétés thérapeutiques.

La synthèse des connaissances bibliographiques à la fois botanique et phytochimique de la famille Apeaceae, confirme bien la richesse des espèces de cette famille en métabolites secondaires, notamment de type coumarine et de type flavonoïde, ce qui ont en fait des marqueurs chimiotaxonomiques intéressants.

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Pituranthos* d'après des données bibliographiques ont montré la richesse des espèces de ce genre en flavonoïdes, coumarines, isocoumarines, composés polyacéthyléniques et acides gras. Les espèces de ce genre sont également connues pour leur richesse en huiles essentielles.

**Références bibliographiques**

- [1] Lawrence GHM. The taxonomy of vascular plants. The macmillan company, New York. 1951.
- [2] James DM, Sylesh KV, John TH. Plant natural products: Back to the future or into extinction. *Phytochemistry* 2007 ; 68 : 2015-2022.
- [3] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Editions du centre national de la recherche scientifique : Paris. 1963.
- [4] Loret V. La flore pharaonique d'après les documents hiéroglyphiques et les spécimens découverts dans les tombes, Edition Ernest Leroux. Paris. 1892.
- [5] Deysson G, Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris. 1979 ; 529 pp.
- [6] Dupont F, Guignard JL. Systématique moléculaire, Abrégé de botanique, 14<sup>ième</sup> édition, Masson, Issy-les-moulineaux. 2007 ; 285 pp.
- [7] Boitineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier, Tec & Doc, Paris. 2010 ; 1335 pp.
- [8] Ozenda P. Flore du Sahara septentrional et central. CNRS. 1958 ; p. 356.
- [9] Haba H. Thèse de magister, Université El-hadj Lakhdar-Batna, 2002.
- [10] BACH, D. ; MASCRE, M. ; DEYSSON, G., Cours De Botanique Générale, Tome 2, Organisation Et Classification Des Plantes Vasculaires, SEDES, Paris, 1979.
- [11] Heywood VH. Les plantes à fleurs, 306 familles de la flore mondiale, Nathan, Paris, 1996 ; 335 p.
- [12] Doneanu C, Anitescu G. Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, *J. Supercrit. Fluids*. 1998; (12) : 59-67.
- [13] Olle M, Bender I. The content of oils in umbelliferous crops and its formation, *Agron. Res*, (Special Issue III). 2010 ; (8) : 687-696.
- [14] Sofowara A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Edition karthala. 2010.
- [15] Boullard B. Plantes médicinales du monde, réalités et croyances, Editions ESTEM. 2001.
- [16] Boitineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier, Tec & Doc, Paris. 2010 ; 1335 pp.
- [17] Murray RDH, Méndez J, Brown SA. The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry, John Wiley & Sons. 1982; 702 p.

- [18] Pubchem substance : [www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance) (dernière consultation août 2012).
- [19] Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc, Paris, 2005 ; 522 pp.
- [20] Cheung CS, Belluomini J, Traditional and new interpretation of prescriptions : the harmonizing group, Journal of the American College of Traditional Chinese Medicine, 1984 ; (1) : 3-15.
- [21] Murry RDH, Mendez J, Brown SA. The natural coumarins, occurrence, chemistry and biochemistry, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1982.
- [22] Abdulmanea AK, Prokudina EA, Lankova AP, Vani-Ckova AL, Koblovska AR, Zeleny BV, Lapcik O. Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. Biochem. Syst. Ecol. 2012; 45: 237-243.
- [23] Tundis R, Bonesi M, Deguin B, Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, Tillequin F. Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit) (Apiaceae). Bioorg. Med. Chem. 2009; 17: 4542-4547.
- [24] Zidorn C, Sturm S, Dawson JW, Klink JW, Syppner H, Perry NB. Chemosystematic investigations of irregular diterpenes in anisotome and related New Zealand Apiaceae. Phytochemistry 2002 ; 59 : 293-304.
- [25] Quezel P et Santa S. Nouvelle fleur de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol.1-2 Ed. CNRS, Paris, France. 1962, 1963.
- [26] Néger R. Petit flore des régions arides du Maroc occidental, Tome 2 Ed. CNRS, Paris France. 1962.
- [27] Kaabeche M. Les groupements végétaux de la région de Bousaada, Thèse Université Paris Sud. 1990.
- [28] Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ed. Ibis Press, Paris. 1997 ; 764p.
- [29] Al kadi AA. Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libye Vol 1-2. 1989.
- [30] Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central Sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105(3) : 358-367.
- [31] Novak I, Buzas G, Minker E, Kolfai M, Szendrei K. Planta med. 1966 ; 14, p : 57.

- [32] Nait Said. Nadla. Etude phytochimique des extraits chlorophormiques des plantes : *Pituranthos chluranthos* et *Marrubium vulgare*. 2007 Mémoire de Magister d'Université EL-Hadj Lakhdar Batna.
- [33] Al kadi, A. A. Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en libie, 1989, Vol 1-2.
- [34] Abdallah HM, Ezzat SM. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. *Z. Naturforsch. C.* 2011 ; 66 : 143-148.
- [35] Djeridane A, Brunel JM, Vidal N, Yousfi M, Ajandouz EH, Stocker P. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavones glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chem. Biol. Interact.* 2008; 172: 22-26.
- [36] Esseid C. Hamadou MH. Ameddah S. Menad A. León F. Brouard I. Marchioni E. Benayache S. Benayache F ; Chemical constituents and antioxidant activity of a polar extract from *Pituranthos battandieri* Maire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.* 2017 ; 9(4) ; 559-566.
- [37] Esseid C. Mechehoud Y. Chalchat JC. Figueredo G. Benayache S. Benayache F ; Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Pituranthos battandieri* Maire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.* 2016 ; 8(10) ; 1731-1734.
- [38] Singab AN, Khalifa T, Mahran GH, Okada Y, Matsumaru Y, Nishino H, Okuyama T. A new flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus* Desf, Benth & Hook. *Natural medicines* (Tokyo). 1998 ; 52(2), 191-194.
- [39] Abdel-Kader MS. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003 ; 14(1), 48-51.
- [40] Abdelwahad A, Hayder N, Hilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hmami M, Chekir-Gherdira L, Ghedira K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss). Maire, *Flavour Fragr. J.* 2006 ; 21(01), 129-133.
- [41] Abdallah HM, Ezzat SM. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. *Z. Naturforsch. C.* 2011 ; 66: 143-148.
- [42] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*. *Phytochemistry.* 1995 ; 40(3), 927-929.

- [43] Haba H, Benkhaled M, Massiot G, Long C, Lavaud C. Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. Nat. Prod. Res. 2004 ; 18(5), 409-413.
- [44] Benmekhbi L, Kabouche A, Kabouche Z, Ait-Kaki B, Touzani R, Bruneau C. Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. Chem. Nat. Comp. 2008 ; 44 : 639-641.
- [45] Gourine N, Merrad B, Yousfi M, Stocker P, Gaydou EM. Chemical composition of the essential oil of *Pituranthos scoparius*. Nat. Prod. Commun. 2011 ; 6(8) : 1151-1154.
- [46] Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. Et Hook. from Algeria. J. Ess. Oil Res. 1999 ; 11(6), 673-676.
- [47] Vérité P, Nacer A, Kabouche Z, Seguin S. Composition of seeds and stems essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur), Schinz, Flavour frag. J. 2004 ; 19, 562-564.
- [48] Boutaghane N, Nacer A, Kabouche Z, Ait-Kaki B. Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian septentrional sahara. Chemistry of natural compound. 2004 ; 40, pp. 606-607.
- [49] Touil A, Rhouati S, J. Creche. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. Chem. Nat. Compd. 2006 ; 42(1), 104-105.
- [50] Neffati A, Bouhlela I, Ben Sghaiera M, Boubakera J, Limema I, Kilani S, Skandrania I, Bhouria W, Le Dauphinc J, Barillier D, Mosrati R, Chekir-Ghediraa L, Ghediraa K. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. Enviro. Toxicol. Pharmacol. 2009 ; 27 : 187-194.
- [51] Neffati A, Limem I, Kilani S, Bouhlel I, Skandrani I, Bhouria W, Ben Sghaier M, Boubaker J, Ledauphin J, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. A comparative evaluation of mutagenic, antimutagenic, radical scavenging and antibacterial activities of essential oils of *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur.). Drug Chem. Toxicol. 2009 ; 32(4) : 372-380.
- [52] Esseid C, Leon F, Mosset P, Benayache S, Marchioni E, Brouard I, Benayache F. Coumarins and other constituents from *Deverra battandieri*. *Phytochemistry Letters*. 2020 ; 1874-1879.

**II- Métabolites secondaires chez les végétaux****Introduction**

Une façon de comprendre la notion de métabolisme secondaire est de passer par un détour historique. Comme chacun sait, de très nombreuses plantes médicinales, tinctoriales ou aromatiques contiennent des métabolites qui leur sont très spécifiques et à des teneurs parfois extrêmement élevées. Pour des raisons économiques, l'étude biochimique de ces composés a fait l'objet d'intenses efforts, contribuant au développement de plusieurs pans entiers de la phytochimie ayant des rapports étroits avec la pharmacie et l'industrie des colorants. Devant la quantité et la diversité des molécules caractérisées s'est rapidement posée la question de leur rôle biologique éventuel. Dans la mesure où ces molécules ne sont retrouvées que chez quelques espèces uniquement, on a d'abord pensé qu'elles ne pouvaient avoir aucun rôle réellement important en comparaison des métabolites universellement représentés comme les glucides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques et dont les fonctions biologiques commençaient déjà à être solidement établies. Une opposition s'est ainsi dessinée entre :

- D'un côté le métabolisme primaire, désignant un métabolisme à la fois universel et participant aux fonctions cellulaires.
- Et de l'autre le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante.

**II.1- Principes généraux de classification des métabolites secondaires**

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les alcaloïdes et composés azotés.
- Les composés phénoliques.
- Les composés terpéniques.

Auxquelles on ajoute classiquement :

- La catégorie des hétérosides, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent

largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extractibilité dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).

- Les molécules désignées sous le terme de « composés mixtes » ou « composés d'origine mixte », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut. Mais souvent, les composés mixtes peuvent être rattachés à l'une des catégories précédentes.

On distingue enfin d'autres familles de métabolites secondaires plus restreintes en termes de nombre de composés et de nombre d'espèces végétales concernées (désignée parfois comme la catégorie des « miscellaneous compounds »). On peut citer par exemple les composés dérivés du soufre présents dans les Aillacées, mais également chez certaines algues et plantes maritimes.

Dans chacune de ces grandes catégories, on distingue quantité de catégories inférieures. Les classifications sont généralement basées sur :

- La nature biochimique des molécules, leurs propriétés et effets biologiques (dans le cas des alcaloïdes).
- et/ou de leur origine biosynthétique.

## **II.2- Les coumarines**

### **II.2.1- Introduction**

Les coumarines constituent l'une des grandes classes de composés d'origine naturelle, leur intérêt est grandissant en raison de leur utilité en tant qu'agents biologiquement actifs. Le squelette de la coumarine représente également la structure de base de plusieurs molécules de produits pharmaceutiques de grande importance.

La coumarine s'est avérée être un agent antibactérien, antioxydant, anti-inflammatoire, anticoagulant et antitumeur. Les propriétés pharmacologiques de la coumarine ont suscité notre intérêt vu les résultats obtenus lors de l'investigation phytochimique que nous avons menée sur l'espèce *P. battandieri* Maire que nous avons sélectionnée pour cette étude.

### **II.2.2- Définition**

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine.

Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 [1]. Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclarée et la lavande. Les coumarines sont des composés phénoliques des végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure [2], Ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques [1].

### II.2.3- Les coumarines dans le règne végétal

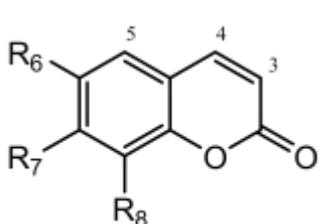
La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connus, sont accumulés par plus de 70 familles de dicotylédones et 9 familles de monocotylédones. Ils sont présents sous forme libre ou hétérosides dans la plupart des familles de dicotylédones incluant Apiaceae, Asteraceae, Fabiaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae.

### II.2.4- Diversité structurale des coumarines

Les coumarines constituent une famille de composés naturels. Selon la nature des substituants présents sur le squelette coumarinique, on peut les classer en plusieurs catégories.

#### II.2.4.1- Coumarines simples

Ce sont les coumarines les plus répandues dans le règne végétal. Plusieurs d'entre elles possèdent des substituants OH (*O*-Glc) et/ou OCH<sub>3</sub> en 6 en 7 et /ou en 8 [3]. Quelques exemples sont reportés dans la (figure II.1).

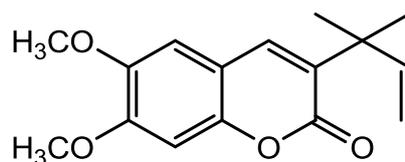


<u>Composés</u>	<u>R<sub>6</sub></u>	<u>R<sub>7</sub></u>	<u>R<sub>8</sub></u>	<u>N°</u>
Daphnétine	H	OH	OH	<b>II-1</b>
Erioside	OH	OH	<i>O</i> -Glc	<b>II-2</b>
Esculétine	OH	H	OH	<b>II-3</b>
Esculine	<i>O</i> -Glc	H	OH	<b>II-4</b>
Fraxétine	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	<b>II-5</b>
Scopolétine	OCH <sub>3</sub>	H	OH	<b>II-6</b>
Umbélliférone	H	H	OH	<b>II-7</b>

**Figure II.1** : Structures chimiques de quelques coumarines simples

#### II.2.4.2- Coumarines prénylées

Ce sont des coumarines portant une unité isoprène, comme la rutacultine **II-8**, (figure II.2).



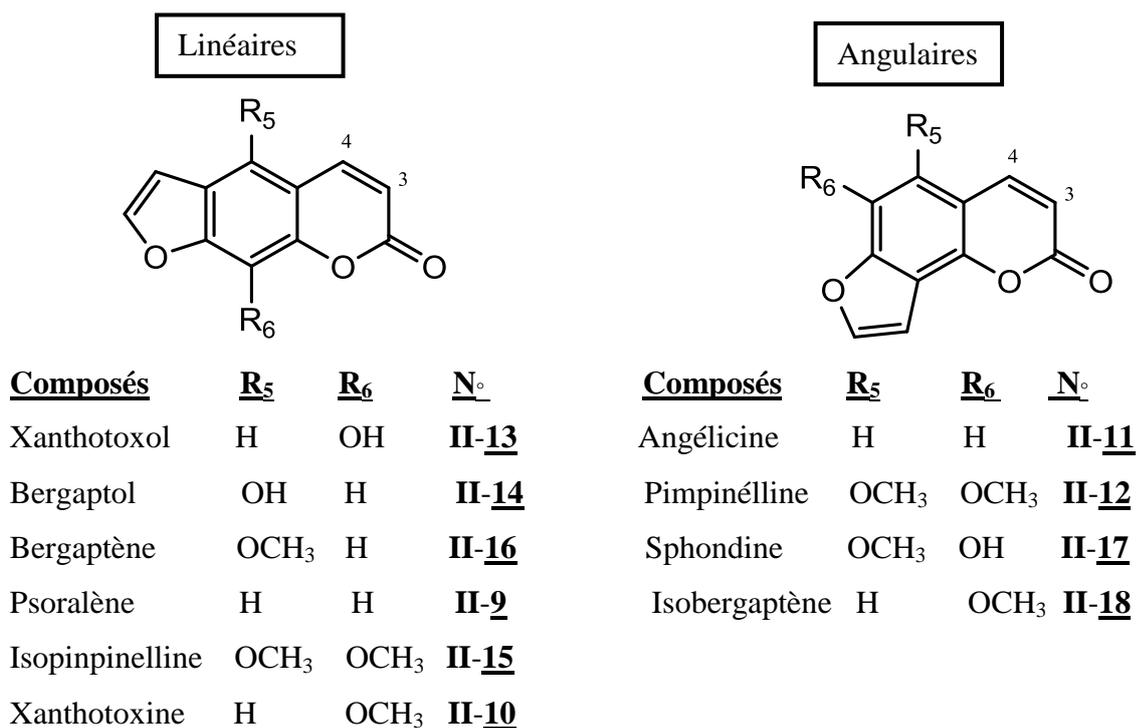
II-8

Figure II.2 : Structure chimique de rutacultine **II-8**

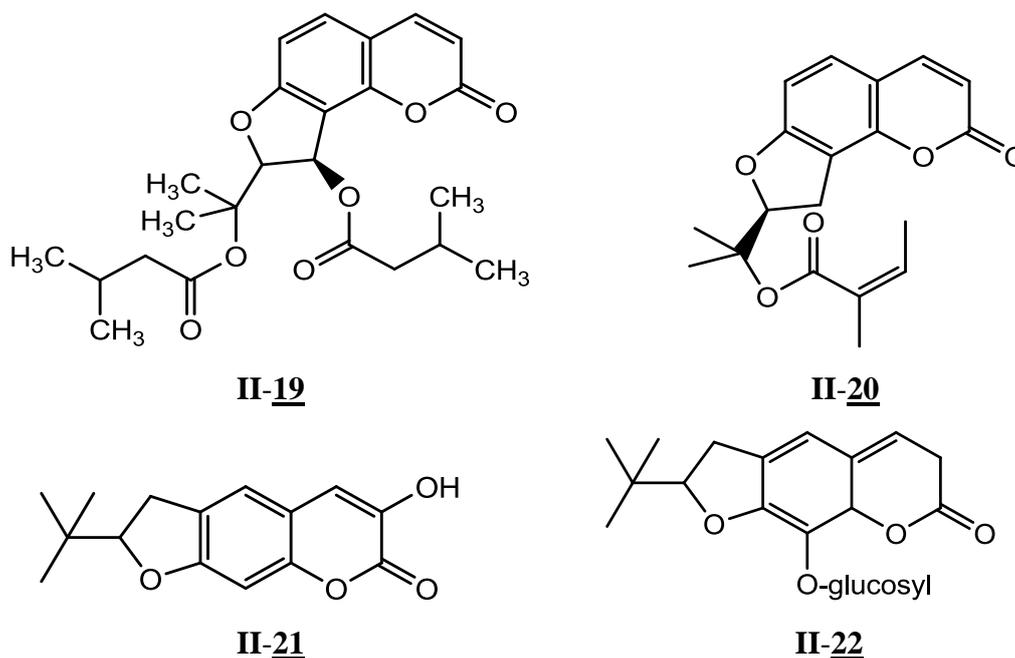
### II.2.4.3- Furanocoumarines (linéaires et angulaires)

Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs. La structure chimique des furanocoumarines est constituée d'un cycle furane fusionné avec la coumarine. L'association peut se faire soit dans le prolongement de la coumarine (forme linéaire), comme le psoralène **II-9** et la xanthotoxine **II-10** ; soit sur le côté (forme angulaire) comme l'angélicine **II-11** et la pimpinelline **II-12**. Ainsi on peut distinguer deux types de furanocoumarines : les furanocoumarines linéaires et furanocoumarines angulaires. De nombreux dérivés de ces structures de base existent avec des ajouts de résidus sur les carbones des positions 5 et/ou 8 pour les linéaires et 5 et/ou 6 pour les angulaires. Ces résidus peuvent être assez simples, comme dans les cas des hydroxypsoralènes comme le xanthotoxol **II-13** et le bergaptol **II-14** ; des méthoxypsoralènes comme la xanthotoxine **II-10**, l'isopimpinelline **II-15** et le bergaptène **II-16** pour les furanocoumarines linéaires ou pour les furanocoumarines angulaires le cas des hydroxy- et des méthoxyangélicines comme la sphondine **II-17**, la pimpinelline **II-12** ou l'isobergaptène **II-18** (Figure II.3). Le cycle furane peut être réduit dans les positions C-9 et C-10 donnant ainsi des dihydrofuranocoumarines comme l'athamantine **II-19** ou la columbianadine **II-20** (Figure II.4).

La plupart des furocoumarines ont cependant des dénominations reprenant le nom des plantes dans lesquelles elles ont été décrites pour la première fois (le bergaptène **II-16** présent dans *Citrus bergamia*, la rutarétine **II-21** et la rutarine **II-22** de *Ruta graveolens*, ou bien encore liées à leurs propriétés, comme la xanthotoxine **II-10** pour sa couleur et son activité biologique. On désigne dans certains cas l'isomère linéaire ou angulaire d'une molécule par le préfixe iso- comme par exemple dans le cas de l'isopimpinelline **II-15** [3].



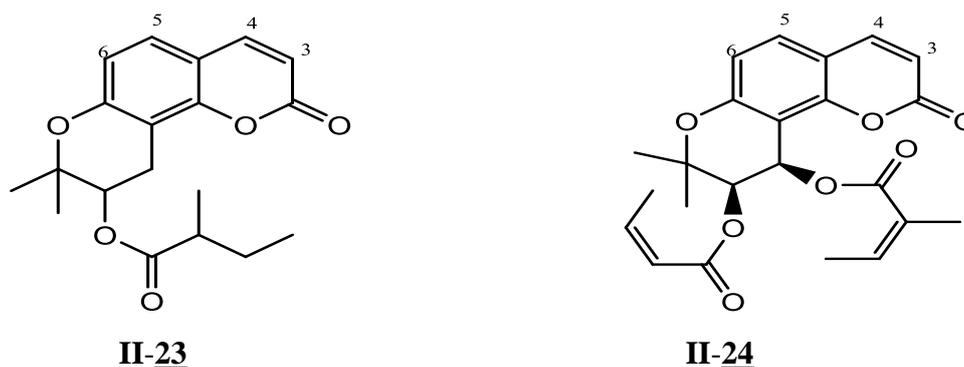
**Figure II.3 :** Structures chimiques de quelques furanocoumarines (linéaires et angulaires)



**Figure II.4 :** Structures chimiques de l'athamantine **II-19**, la columbianadine **II-20**, la rutarétine **II-21** et la rutarine **II-22**

### II.2.4.4- Pyranocoumarines

Les pyranocoumarines contenant un seul cycle pyranique sont dites « pyranocoumarines simples », ce sont des composés formés par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine soit dans le prolongement (forme linéaire), soit latéralement (forme angulaire) [3]. Elles présentent des structures parfois assez attrayantes pour un chimiste grâce à leur substitution comme la 2',3'-dihydro jatamansine **II-23** et l'anomaline **II-24** (Figure II.5).

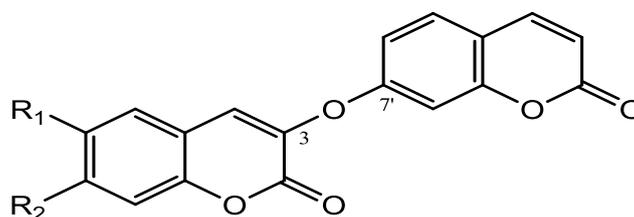


**Figure II.5 :** Structures chimiques de la 2',3'-dihydro jatamansine **II-23** et l'anomaline **II-24**

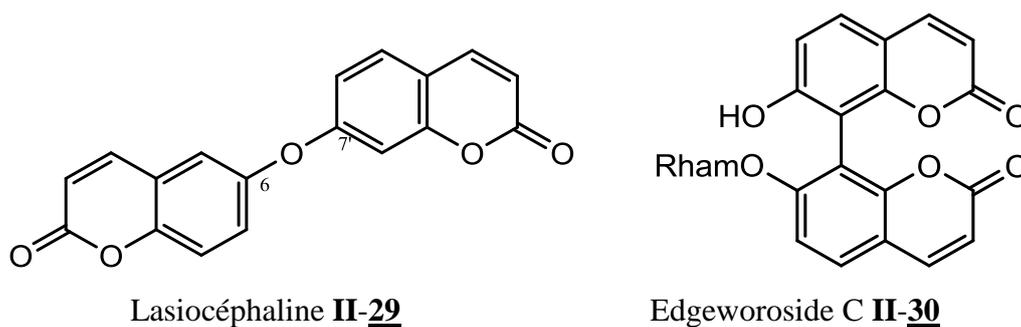
Les coumarines comportant deux cycles pyraniques sont connues sous le nom de dipyrano-coumarines. La diversification de leurs structures provenant de la nature des substitutifs du squelette coumarinique notamment la position C-4 a fait qu'elles sont divisées en séries et chaque série en groupes [3].

### II.2.4.5- Coumarines à l'état dimérique (bicomarines)

Les bicomarines sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariniques simples [3]. Quelques molécules de ce type sont reportées dans la (figure II.6).



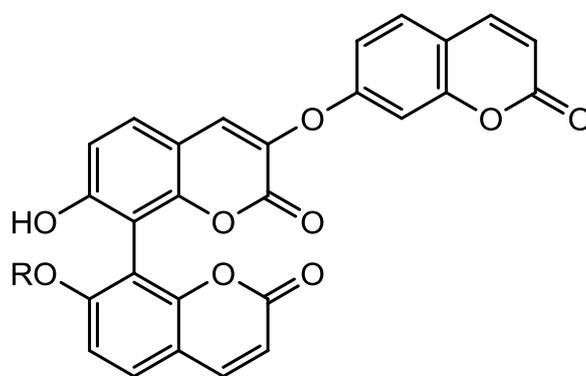
<u>Composés</u>	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>N<sup>o</sup></u>
Daphnorétine	OCH <sub>3</sub>	OH	<b>II-25</b>
Rutamontine	OH	OCH <sub>3</sub>	<b>II-26</b>
Daphnorine	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -Glu	<b>II-27</b>
Edgeworine	H	OH	<b>II-28</b>



**Figure II.6 :** Structures chimiques de quelques bicoumarines

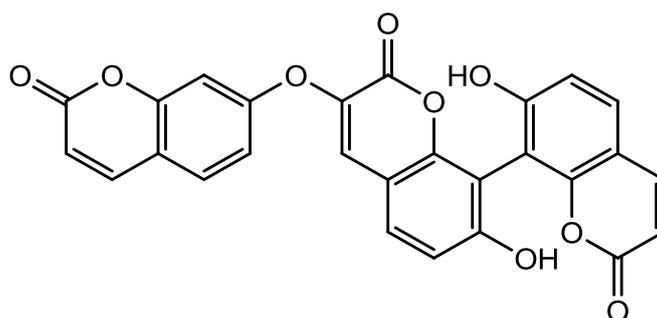
#### II.2.4.6- Coumarines à l'état trimérique (tricoumarines)

Ce sont des composés issus de l'union de trois unités coumariques, (figure II.7).



Edgeworoside A **II-31**, (R=Rhamnosyle)

Edgeworoside B **II-32**, (R=Glucosyle)



Triumbéllatine **II-33**

**Figure II.7 :** Structures chimiques de quelques tricoumarines

#### II.2.5- Intérêt pharmacologique des coumarines

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone [4, 5, 6,7].

Les coumarines simples contribuent généralement à fluidifier le sang par leur activité veinotonique et vasculoprotecteur, c'est le cas de l'esculoside du marronnier d'Inde, ou le dicoumarol, un anticoagulant produit par le mélilot (*Melilotus officinalis*). L'intérêt des furanocoumarines a été signalé dans le cas du traitement des spasmes néphrétiques, de l'angine de poitrine. La capacité que possèdent diverses structures furanocoumariniques à provoquer une hyperpigmentation cutanée transitoire est bien connue. Ces propriétés photodynamisantes sont mises à profit dans le traitement des manifestations du vitiligo, du psoriasis et d'autres affections dermatologiques. Elles peuvent aussi être utiles dans les cures de bronzage (crèmes à base de psoralène, bergaptène). La visnadine, une pyranocouamrine, est douée de propriétés vasodilatatrices coronariennes et présentée comme ayant une action favorable sur les troubles de la sénescence cérébrale.

### II.2.6- La toxicité des coumarines

Le jus de *l'Ammivisnaga* L. (Apiaceae), ainsi que les graines de *Psoralea* (Fabaceae), ont été utilisées par les égyptiens pour les manifestations du vitiligo [1]. Les constituants phototoxiques, communs à toutes ces espèces, sont des furanocoumarines linéaires : psoralène, bergaptène et xanthotoxine ; les furanocoumarines angulaires ne sont que faiblement phototoxiques (angélicine, pimpinelline). Il a été démontré que les furanocoumarines peuvent donner lieu à des cycloadditions sur les carbones (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) et/ou (C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub>) avec les bases pyrimidiques de l'ADN. Ces cyclo additions peuvent être mono ou bifonctionnelles et, dans ce dernier cas, elles établissent des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques et induisent des liaisons du génome. Il est possible que ces propriétés aient un rapport avec la phototoxicité dont le mécanisme reste à élucider. Elles expliquent mieux les propriétés mutagènes et cancérogènes [1].

En 1941, le dicoumarol s'est avéré être le composé responsable de la morthémorragique du bétail après la consommation du foin de Melilot blanc (*Melilotus alba*) de la famille Fabaceae [8].

### II.2.7- Activités biologiques des coumarines

Les Coumarines possèdent de nombreuses propriétés biochimiques et pharmacologiques et leurs activités dépendent de la structure et de la nature des substituant [9-11]. On peut citer par exemple, des activités de réduction d'œdèmes [12-14], de vasodilatation [15,16], antiinflammatoire [17-18], antimicrobienne [19-20], antivirale [21], antifongique [22], antiplasmodiale [23], anticonvulsivant [24-25], anti tumorale [26-27], anticancéreuse [28-29],

d'inhibition d'enzyme [30-31]. Elles peuvent aussi manifester des effets oestrogéniques [32], antinéoplasiques [33]. Elles inhibent l'agrégation plaquettaire [34] ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase [35-36].

Kaneko [37] et Zhang [38] ont étudié en particulier l'influence de la structure des coumarines sur leur activité antiradicalaire. Ils ont mis en évidence que la structure caractéristique des coumarines, c'est-à-dire la 1,2-pyrone, affecte peu l'activité antioxydante de ces molécules. Par contre, la présence d'une fonction catéchol a un rôle important pour les propriétés antiradicalaires [37, 39, 40, 10].

**Tableau II.1:** Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines

Activité	Facteurs accroissant l'activité
Antiradicalaire	-Nombre de groupements OH libre -La présence d'une partie catécho
Inhibition de la xanthine oxydase	-Absence de groupement en C5 -Présence de la double liaison C4-C3 -Groupement OH libres en C7, C6 -La petite taille des groupements substituant la position C4
Cytotoxiqu	-Présence d'une partie catéchol -2 groupements phénoliques en positions 6,7 ou en 6,8

Les Coumarines ont un potentiel cytotoxique pouvant s'avérer intéressant dans le cas traitement d'un anti tumoral [10]. En effet, il est apparu que la cytotoxicité des coumarines est dépendante de la cellule ciblée .

De par leur propriété chélatante, antioxydante et anticoagulante [41], les coumarines apparaissent comme des molécules potentiellement cytotoxiques à intérêts thérapeutiques [10].

D'une manière générale, les coumarines sont considérées comme des phytoalexines produites en réponse à des attaques pathogènes ou des stress abiotiques [42]. Des études ont d'ailleurs confirmé l'activité insecticide et larvicide des furocoumarines [43,44]. La

protection des plantes contre les herbivores, les insectes et les microorganismes pathogènes est due aux propriétés phototoxiques de ces molécules [45].

Chez les humains, les furocoumarines sont à l'origine de problèmes de photosensibilisation. Bien que ce phénomène de photosensibilisation soit incommode pour les personnes saines, il est en revanche mis à profit dans le traitement de certaines pathologies de la peau telles que le vitiligo ou le psoriasis [46].

L'utilisation des furocoumarines est retrouvée dans le cadre des nouveaux développements des divers domaines thérapeutiques, comme le traitement symptomatique de multiples scléroses [47], la photo chimiothérapie de lymphome à cellules T [48] et la chimiothérapie de tumeurs résistantes à la poly chimiothérapie [49].

## **II.2.8- Propriétés physico-chimiques des coumarines**

### **II.2.8.1- Fluorescence sous la lumière UV**

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence sous UV à 366 nm de couleur bleue, violette ou rose, vert, jaune ou pourpre [50,51]. Cette fluorescence est en général :

- Bleue pour les coumarines hydroxylées en 7 (Umbélliférone).
- Pourpre pour les coumarines prénylées.
- Jaune pour les Furanocoumarines [51].

Cette fluorescence est intensifiée sur le chromatogramme, observé sous la lumière UV par les vapeurs de NH<sub>3</sub>, par pulvérisation du chromatogramme par le réactif de Bornträger ou l'acétate de plomb.

### **II.2.8.2- Analyse structurale**

#### **A) Spectroscopie infrarouge IR**

Cette technique fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule. Pour les coumarines :

- L'absorption C=O de la lactone conjuguée apparaît pratiquement dans la région 1550-1750 cm<sup>-1</sup> [52,11].
- L'absorption OH du phénol est observée à 3550 cm<sup>-1</sup>

#### **B) Spectroscopie ultraviolette UV**

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants et profondément modifié en milieu alcalin : KOH, NaOH, NaOCH<sub>3</sub> et

en présence de  $\text{AlCl}_3$  qui forme un complexe avec les hydroxyles portés par des carbones adjacents, ce qui induit un déplacement bathochrome [53]. Pour la coumarine, les absorptions maximales sont présentées dans deux bandes à  $276 \text{ cm}^{-1}$  et  $311 \text{ cm}^{-1}$

La présence des substituant alkyles induit des modifications des valeurs de la bande en  $311 \text{ cm}^{-1}$  qui est déplacée vers  $325 \text{ cm}^{-1}$  [54]. Selon la position des OH, le déplacement est plus au moins fort [53].

### **C) Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H**

En RMN du proton, l'observation d'une paire de doublets de constante de couplage 9,5 Hz, centrés entre 6,1-6,4 et entre 7,5-8,3 ( $\text{CDCl}_3$ ) correspond respectivement aux signaux des protons  $\text{H}_3$  et  $\text{H}_4$  et est caractéristique d'une coumarine non substituée sur le cycle pyrone. Cependant la présence d'une oxygène ou d'un substituant alkyle en C5, décale de façon caractéristique la résonance du proton  $\text{H}_4$  vers 7,9-8,2 ppm [55, 56].

### **Conclusion**

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement.

A l'issue de cet inventaire des métabolites secondaires il faut souligner la grande variété structurale des coumarines. Environ 1300 coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires dans des plantes vertes, mais aussi dans les champignons et les bactéries. Cette classe renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques.

## Références bibliographiques

- [1] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc, Paris. 1999.
- [2] Alignan M. Thèse de doctorat, Phoma du tournesol, déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse. 2006.
- [3] Harkati B. valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae, *Scorzonera undulata*, thèse de doctorat Université Mentouri Constantine. 2011.
- [4] Barnard DL, Xu ZQ, Stowell VD, Yuan H, Smee DF, Samy R, Sidwell RW, Nielsen MK, Sun L, Cao H, Li A, Quint C, Deignan J, Crabb J, Flavin MT. Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002 ; 13 : 39-59.
- [5] Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *curr. Med. Chem.- Anticancer agents.* 2005 ; 5: 29-46.
- [6] Sarker SD, Nahar L, Rahman MN, Siakalima M, Kumarasamy Y. Bioactivity of Umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*, *Ars Pharm.* 2005 ; 46 : 35-41.
- [7] Kostova I, Raleva S, Genova P, Argirova R. Structure-Activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2006; 68274: 1-9.
- [8] Booth NL, Dejan N, Richard B, Stacie E. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004 ; 76 : 511-516.
- [9] Fylaktakidou, K. C., Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E. and Nicolaidis, D. N., *Current Pharmaceutical Design, Natural and synthetic coumarin derivatives with antiinflammatory/antioxidantactivities*, 10, 2004, 3813.
- [10] Kostova, I., *Current Medicinal Chemistry, Anticancer Agents, Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents*, 5, 2005, 29.
- [11] Kostova, I. and Mojzis, J., *Future HIV Therapy, Biologically active coumarins as inhibitors of HIV-1*, 1, 2007, 315.
- [12] Lake, B. G., *Food and Chemical Toxicology, Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment*, 37, 1999, 423.

- [13] Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D. and Daston, G. P., Food and Chemical Toxicology, A safety assessment of coumarin taking in to account species-specificity of toxicokinetics, 44, 2006, 462.
- [14] Casley-Smith, J. R., International Journal of Angiology, Benzo-pyrone in the treatment of lymphoedema, 18 (1), 1999, 31.
- [15] Chen, J., Chiou, W. F., Chen, C. C. and Chen, C. F., J. Urol., Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro, 163 (6), 2000, 1975.
- [16] He, J. Y., Zhang, W., He, L. C. and Cao, Y. X., European Journal of Pharmacology, Imperatorin induces vasodilatation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated  $Ca^{2+}$  influx and release, 573, 2007, 170.
- [17] Liu, J. X., Zhang, W. P., Zhou, L., J. Chin. Med. Mater, anti-inflammatory effect and mechanism of osthol in rats, 28, 2005, 1002.
- [18] Menghini, L., Epifano, F., Genovese, S., Marcotullio, M. C., Sosa, S. and Tubaro, A., Phytotherapy Research, Anti-inflammatory Activity of Coumarins from *Ligusticum lucidum* Mill. subsp. *cuneifolium* (Guss.) Tamaro (Apiaceae), 24, 2010, 1697.
- [19] Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. and Vuorela, P., Journal of Ethnopharmacology, Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland, 73, 2000, 299.
- [20] Melliou, E., Magiatis, P., Mitaku, S., Skaltsounis, A.-L., Chinou, E. and Chinou, I., Journal of Natural Products, Natural and synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins with antibacterial activity, 68, 2005, 78.
- [21] Ju, Y., Zhao, Y. F., Srill, C. C. and Sacalis, J. N., Tsinghua Science and Technology, Cytotoxic compounds from *Zanthoxylum americanum*, 5, 2000, 159.
- [22] Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J. W., Spande, T. F., Nimit, Y. and Tochanarusngrai, S., Planta Medica, Coumarins and carbazoles from *Clausena excavate* exhibit antimicrobial and antifungal activities, 69, 2003, 155.
- [23] Yenjai, C., Sripontan, S., Sriprajun, P., Kittakoop, P., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y., Planta Medica, Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*, 66, 2000, 277.
- [24] Luszczki, J. J., Wojda, E., Andres-Mach, M., Cisowski, W., Glensk, M., Glowniak, K. and Czuczwar, J. S., Epilepsy Research, Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of

- imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshockseizure and chimney tests in mice: A comparative study, 85, 2009, 293.
- [25] Luszczi, J. J., Wojda, E., Raszewski, G., Glowniak, K. and Czuczwar, S. J., Pharmacological Reports, Influence of imperatorin on the anticonvulsant and acute adverse-effectpotential of lamotrigine in maximal electroshock-inducedseizures and chimney test in mice, 60, 2008, 566.
- [26] Luszczi, J. J., Glowniak, K. and Czuczwar, S. J., European Journal of Pharmacology, Imperatorinenhances the protective activity of conventional antiepileptic drug against maximal electroshock-inducedseizures in mice, 574, 2007b, 133.
- [27] Chou, S. Y., Hsu, C. S., Wang, K. T., Wang, M. C. and Wang, C. C., Phytotherapy Research, Antitumoreffects of Ostholfrom *Cnidiummonnieri* : an in vitro and in vivo study, 21, 2007, 226.
- [28] Zhou, J., Cheng, W. X. and Xu, Y. H., Zhejiang. J. Integr. Tradit. West Med. Experimental study on antitumoureffect of ostholeextractedfrom the fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, 12, 2002, 76.
- [29] You, L., An, R., Wang, X. and Li, Y., Bioorganic&MedicinalChemistryLetters, Discovery of novelostholederivatives as potential anti-breast cancer treatment, 20, 2010, 7426.
- [30] Ho, P. C., Saville, D. J. and Wanwimolruk, S., Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds, 4 (3), 2001, 217.
- [31] Kleiner, H. E., Xia, X., Sonoda, J., Zhang, J., Pontius, E., Abey, J., Evans, R., Moore, D. D. and DiGiovanni, J., Toxicology and AppliedPharmacology, Effects of naturally occurringcoumarins on hepaticdrug-metabolizing enzymes in mice, 232, 2008, 337.
- [32] Zhang, Q., Qin, L. and He, W., Planta Medica, Coumarins from *Cnidiummonnieri* and theirantiosteoporoticactivity, 73, 2007, 13.
- [33] Okamoto, T., Kawasaki, T., Hino, O., Biochem. Pharmacol, Ostholprevents anti-fas antibodyinducedhepatitis in mice by affecting the caspase-3-mediated apoptotic pathway, 65, 2003, 677.
- [34] Chen, K. S., Wu, C. C., Chang, F. R., Chiang, M. Y., Wang, W. Y. and Wu, Y. C., PlantaMedica, Bioactive coumarinsfrom the leaves of *Murrayaomphalocarpa*, 69, 2003, 654.

- [35] Kang, S. Y., Lee, K. Y., Sung, S. H., Park, M. J. and Kim, Y. C., *Journal of Natural Products*, Coumarins from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships, 64, 2001, 683.
- [36] Dall'Acqua, S., Maggi, F., Minesso, P., Salvagno, M., Papa, F., Vittori, S. and Innocenti, G., *Fitoterapia*, Identification of non-alkaloid acetyl cholinesterase inhibitors from *Ferulago campestris* (Basser) Grecescu (Apiaceae), 81, 2010, 1208. Chapitre : Aperçu Bibliographique.
- [37] Kaneko, T., Baba, N. and Matsuo, M., *Chemico-Biological Interactions*, Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity, 142, 2003, 239.
- [38] Zhang, H. Y. and Wang, L. F., *Journal of Molecular Structure Theochem*, Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical, 673, 2004, 199.
- [39] Chang, W. S. and Chiang, H. C., *Anticancer Research*, Structure-activity relationship of coumarin in xanthine oxidase inhibition, 15, 1995, 1969.
- [40] Kolodziej, H., Kayser, O., Woerdenbag, H. J., Van Uden, W. and Pras, N., *Journal of Biosciences*, Structure cytotoxicity relationship of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines, 52, 1997, 240.
- [41] Monti, M., Pinotti, M. and Appendino, G., *Biochim Biophys Acta*, Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol, 1770, 2007, 1437.
- [42] Masuda, T., Takasugi, M. and Anetai, M., *Phytochemistry*, Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*, 47, 1998, 13.
- [43] Rosenthal, G. A. and Barenbaum, M. R., *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, 2nd edition, Academic Press: New York, 1, 1992.
- [44] Hadacek, F., Müller, C., Werner, A., Greger, H. and Proksch, P., *Journal of Chemical Ecology*, Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum ostruthium* (Apiaceae: Apioideae), 20, 1994, 2035.
- [45] Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. and Vuorela, P., *Journal of Ethnopharmacology*, Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland, 73 (1-2), 2000, 299.
- [46] Diawara, M. M., Allison, T., Kulkosky, P. and Williams, D. E., *Cancer Letters*, Psoralen induced growth inhibition in Wistar Rats, 114, 1997, 159.
- [47] Pereira, L., Villinger, F., Wulff, H., Sankaranarayanan, A. and Raman, G., *Experimental Biology and Medicine*, Pharmacokinetics, toxicity, and functional studies

- of the selective kv1.3 channelblocker 5-(4-Phenoxybutoxy) Psoralen in rhesus Macaques, 232, 2007, 1338.
- [48] Plumas, J., Drillat, P., Jacob, M. and Richard, M. J., Bulletin Du Cancer, Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cellproliferations, 90, 2003, 763. Chapitre : Aperçu Bibliographique.
- [49] Kawase, M., Sakagami, H., Motohashi, N., Hauer, H., Chatterjee, S. S. and Spengler, G. In Vivo, Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multi drug resistance reversalactivity, 19, 2005, 705.
- [50] Brou, K. G., Mamyrbekova-Bekro, J. A., Dogbo, D. O., Gogbeu, S. J. and Bekro, Y-A., European Journal of Scientific Research, On the Qualitative Phytochemical Composition of Crude Hydromethanolic extracts of the Leaves of 6 Varieties of *Manihot esculenta* Crantz of Côte d'Ivoire, 45 (2), 2010, 200.
- [51] Wagner, H., Bladt, D. and Zgainski, E., Plant druganalysis, a thinlayer, chromatography, Springer Verlag: Berlin, 2nd edition, 1996.
- [52] Prachyawarakorn, V., Mahidol, C., and Ruchirawat, S., Phytochemistry, Pyranocoumarins from the Twigs of *Mammeasiamensis*, 67, 2006, 924.
- [53] Bruneton, J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4ième édition, Lavoisier : Tec & Doc : paris, 2009.
- [54] Widodo, G. P., Sukrasno, S. E. Y. and Adnyna, I. K., International Journal of Pharmacology, A coumarinfrom *Ageratum* leaves (*Ageratum conyzoides*L.), 4, 2008,56.
- [55] Tosun, A., Baba, M., Baba, M. and Okuyama, T., Turkish Journal of Chemistry, Pyranocoumarinsfrom *Seseligummiferum*subsp. *Corymbosum* growing in Turkey, 29, 2005, 327.
- [56] Helle R., Sansei N., Michiko S., and Lx X. (1990): Phenolic compound from *plantago asiatica*. Phytochemistry, 29 3627-3631



*Partie*  
*Matériel et méthodes*

### III- Etude phytochimique et biologique de *Pituranthos battandieri* Maire

#### III.1- Etude bibliographique

Parmi les plantes du genre *Pituranthos* (Apiaceae), *P. battandieri* Maire, est une plante endémique du Sahara algéro-marocain. Cette espèce n'a été jamais étudiée que par notre promotrice E.C dans le projet de son doctorat [1-3], et par un autre chercheur M.I de même unité de recherche (VARENBIOMOL) [4].

#### III.2- Place dans la systématique

D'après, Quézel et Santa, 1963, *Pituranthos battandieri* Maire *ssp. abbreviatus* Maire, synonyme : *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek. Est classé comme suit :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Tracheophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Araliales
- Famille : Apiaceae
- Genre : *Pituranthos* (*Deverra*)
- Espèce : *Pituranthos battandieri*

**Nom botanique :** *Pituranthos battandieri* Maire

**Synonyme :** *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek

#### III.3- Description botanique

Plante à feuilles de la base persistantes, d'un vert glauque, à tiges plus courtes (10-40 cm) blanchâtres, La tige est généralement creuse. Les feuilles sont alternes, et ont souvent un aspect finement découpé en folioles, les fleurs à stigmate pourpre, les pétioles sont élargis à leur base en engainant souvent la tige [5].

#### III.4- Répartition géographique

Elle est commune au Sahara algérien, Sahara marocain et l'Oranie (Figure III.1).



**Figure III.1 :** Photo de *Pituranthos battandieri* Maire ssp. *abbreviatus* Maire

### III.5- Matériels et méthodes utilisés pour l'étude phytochimique

#### ➤ Solvants utilisés et réactifs

Le cyclohexane, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme, l'éthanol, l'acide acétique, l'acide chlorhydrique, le chlorure ferrique, l'ammoniaque, acide sulfurique, anhydride acétique, hydroxyde de sodium, acétate de sodium, carbonate de sodium, iodure de potassium, hydroxyde de potassium, copeaux de magnésium, DPPH, réactif de Dragendorff, réactif de folin et l'eau.

#### ➤ Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

Les analyses des extraits, des fractions et des produits séparés, ont été faites sur plaques CCM avec le gel de silice 60 comme phase stationnaire, le type de plaques est GF<sub>254</sub> Merck, 0,2 mm sur support plastique.

#### ➤ Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC)

Une colonne (15×200 mm), le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0.063-0.200 mm (70-230 mesh), Merck HF<sub>60</sub>.

### III.6- Etude phytochimique de *Pituranthos battandieri* Maire

#### III.6.1- Récolte du matériel végétal

La plante *Pituranthos battandieri* Maire, a été récoltée durant le mois d'avril 2010 de la région de Béchar (Sud algérien). La détermination botanique a été effectuée sans équivoque et un voucher a été conservé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL.

#### III.6.2- Screening phytochimique (Travail personnel)

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet de détecter la présence ou l'absence des familles chimiques essentiellement telles que les composés phénoliques, les hétérosides notamment les saponosides, les composés azotés en particulier les alcaloïdes, les isoprénoides qui renferment les stéroïdes, et les composés terpéniques et triterpéniques. Il est basé sur :

- Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente.
- Des réactions de coloration et de précipitation.
- L'examen sous la lumière ultraviolette.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé le screening phytochimique des parties aériennes de l'espèce sélectionnée *Pituranthos battandieri* Maire. Il est connu que les plantes du genre *Pituranthos* contiennent des coumarines et en particulier des furanocoumarines [6]. Ces molécules sont considérées comme responsables de nombreuses activités biologiques observées chez les plantes du même genre à titre d'exemple, *Pituranthos triradiatus* [7].

##### III.6.2.1- Recherche des alcaloïdes

Nous avons placé 5 g de poudre végétale (parties aériennes de l'espèce étudiée) dans 25 ml d'acide sulfurique dilué à 10% dans un erlen Meyer de 250 ml tout en agitant. Le matériel végétal est laissé macérer pendant 24 heures. La matière végétale est retirée de la solution par filtration et lavage avec une petite quantité d'eau distillée de manière à obtenir 25 ml de filtrat.

Cette technique de caractérisation est une réaction de précipitation, pour cela, nous prenons deux tubes à essai et nous introduisons 1 ml de filtrat dans chacun, puis on rajoute 3 gouttes de réactif de Dragen-Dorff au premier et on laisse le deuxième comme témoin [8].

- L'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes [9] (Figure III.2).



**Figure III.2 :** Test de la mise en évidence des alcaloïdes

### III.6.2.2- Recherche des saponines (indice de mousse)

Une quantité de 5 g de matière végétale des tiges broyées sont mis dans un erlen Meyer dans lequel on ajoute 50 ml d'eau distillée, pour réaliser une décoction pendant 30 min. Après refroidissement suivi d'une filtration 5 ml du décocté sont prélevés et introduits dans un tube à essai soumis à une agitation.

- L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines [8] (Figure III.3).



**Figure III.3 :** Test de recherche des saponines

### III.6.2.3- Recherche des terpènes et des stérols insaturés

La présence des stérols insaturés et terpènes est mis en évidence à l'aide de  $H_2SO_4$  [8]. Les étapes à suivre sont :

1. Un mélange MeOH/ $H_2O$  (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale.
2. Après Agitation, filtration et concentration non à sec on ajoute 50 ml d'éther de pétrole à la solution obtenue et on laisse décanter.
3. Après séparation des deux phases on procède à l'évaporation à sec de la phase étherée, l'extrait obtenu est additionné de 15 ml de chloroforme.

4. La solution chloroformique est versée dans trois tubes à essai en quantités égales (Figure III.4).

**Tube (1)** : utilisé comme témoin.

**Tube (2)** : Ajouter 3 ml d'anhydride acétique, le changement rapide de couleur indique la présence de terpènes.

**Tube (3)** : Ajouter 3 gouttes d'acide acétique ; l'apparition de la couleur rouge cerise confirme la présence des stérols insaturés.

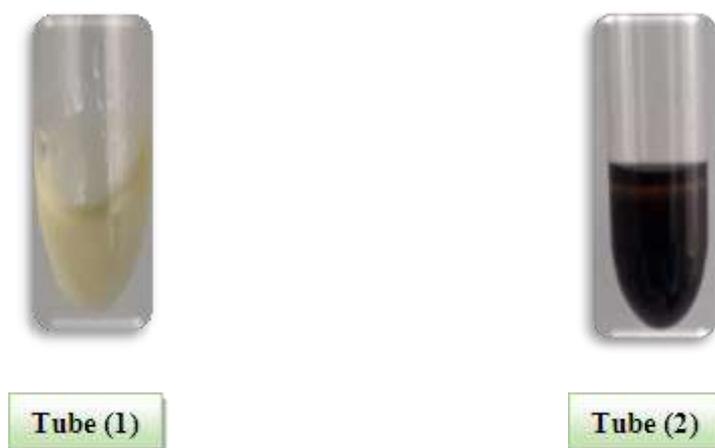


**Figure III.4** : test caractéristique des stérols et des terpènes

#### III.6.2.4- Recherche des triterpènes

Les étapes à réaliser sont [8] :

1. Un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale.
  2. Après agitation, filtration et évaporation à sec, le résidu obtenu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique, puis dans 1 ml de chloroforme.
  3. Diviser la solution entre deux tubes à essai dont l'un sert de témoin.
  4. placer 1 ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter.
- La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone du contact des deux liquides révèle la présence des triterpènes (Réaction de Libermann-Bouchard) (Figure III.5).



**Figure III.5 :** Test de mise en évidence de la présence de triterpènes

### III.6.2.5- Recherche des quinones

Broyer 5 g de matériel végétal et les humecter de quelque goutte de HCl. Mettre à macérer ce matériel végétal pendant une heure à 24 heures dans un erlen Meyer fermé et contenant 10 ml d'éther de pétrole. Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10%.

- La coloration rouge virant ou violet apparait en présence des quinones [10] (Figure III.6).



**Figure III.6 :** Test caractéristique des quinones

### III.6.2.6- Recherche des substances polyphénoliques

#### a) Tanins catéchiques

-5 g de matière végétale sont placés dans 50 ml d'eau distillée bouillante et laissés infuser pendant 30 min.

-2 ml de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai dans lequel on ajoute 3 gouttes de chlorure ferrique  $\text{FeCl}_3$  (1%).

- L'apparition d'une coloration, ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques (Figure III.7).

#### b) Tanins galliques

- Prendre 2 ml de l'infusé précédent et les mettre dans un tube à essai, puis saturer la solution en acétate de sodium, ajouter quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  [8].

- La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques (Figure III.7).



**Figure III.7 :** Test de caractérisation des tanins galliques et catéchiques

#### III.6.2.7- Recherche des coumarines

1. Ajouter 20 ml d'éther de pétrole à 1 g de la poudre végétale à analyser.
  2. Agiter l'ensemble et laisser macérer pendant 24 h.
  3. Filtrer et compléter à 20 ml avec de l'eau distillée.
  4. Evaporer l'extrait éther à l'air libre jusqu'à obtention de 5 ml et reprendre avec de l'eau distillée chaude (2 ml).
  5. Partager la solution en deux tubes à essai dont l'un sert de témoin.
  6. Ajouter au contenu de l'autre tube de l'ammoniaque à 25 %.
  7. Mélanger et observer la fluorescence sous UV à 365 nm.
- Une fluorescence intense dans le tube contenant de l'ammoniaque indique la présence des coumarines (Figure III.8).



**Figure III.8 :** Test de caractérisation des coumarines

**III.6.2.8- Recherche des flavonoïdes**

Une quantité de 5 g de matériel végétal placé dans un erlen Meyer sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube. Additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai, 1 ml de NaOH (1N), 1 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl concentré et des copeaux de magnésium. En présence de flavonoïdes, les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées. Ces couleurs correspondent respectivement aux anthocyanes, flavonols, flavonones, isoflavones et leucoanthocyanes (Figure III.9).



**Figure III.9 :** Test de caractérisation des flavonoïdes

**III.6.2.9- Recherche des anthocyanes**

Prendre 2,5 g de matière végétale et ajouter 50 ml d'eau bouillante, et laisser pendant 15 minutes. Filtrer, et compléter avec un peu d'eau chaude le filtrat à 50 ml. Prendre 5 ml et y ajouter 5 ml d'acide sulfurique à 10% puis 5 ml d'ammoniaque à 10%.

- Si une coloration apparait après acidification puis vire vers le bleu-violacé en milieu basique ; il y a présence d'anthocyanes (Figure III.10).



**Figure III.10 :** Test de caractérisation des anthocyanes

**III.6.2.10- Recherche des anthraquinones**

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait chloroformique dont :

**Tube (1) :** utilisé comme témoin.

**Tube (2) :** on ajoute KOH 10 %

- Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par le virage de la phase aqueuse en rouge (Figure III.11).



**Figure III.11 :** Test de caractérisation des anthraquinones

**III.6.3- Extraction de la plante**

Une quantité de 3350g de matériel végétal (parties aériennes) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) dans les proportions (80/20 ; v/v) pendant 24 heures. Cette macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et toujours pendant 24 heures. Les 4 extraits hydrométhanoliques sont réunis, concentrés à une température n'excédant pas 35 °C environ.

Après concentration sous vide, l'extrait méthanolique est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche. Après filtration, la solution subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois. Les quatre phases organiques ainsi obtenues (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis filtrées et concentrées sous pression réduite à sec et pesées (température 35°C environ).

**Calcul du rendement**

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal sec utilisé pour l'extraction en gramme. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{M_0}{M_1} \times 100$$

$M_0$  : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé

$M_1$  : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau III.1.

**Tableau III.1** : Masses et rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Les parties aériennes de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire (3350 g)	éther de pétrole	0,9	0,03 %
	chloroforme	17,5	0,52 %
	acétate d'éthyle	10,11	0,30 %
	<i>n</i> -butanol	71,21	2,13 %

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme (Figure III.12) montrant les différentes étapes du processus d'extraction.

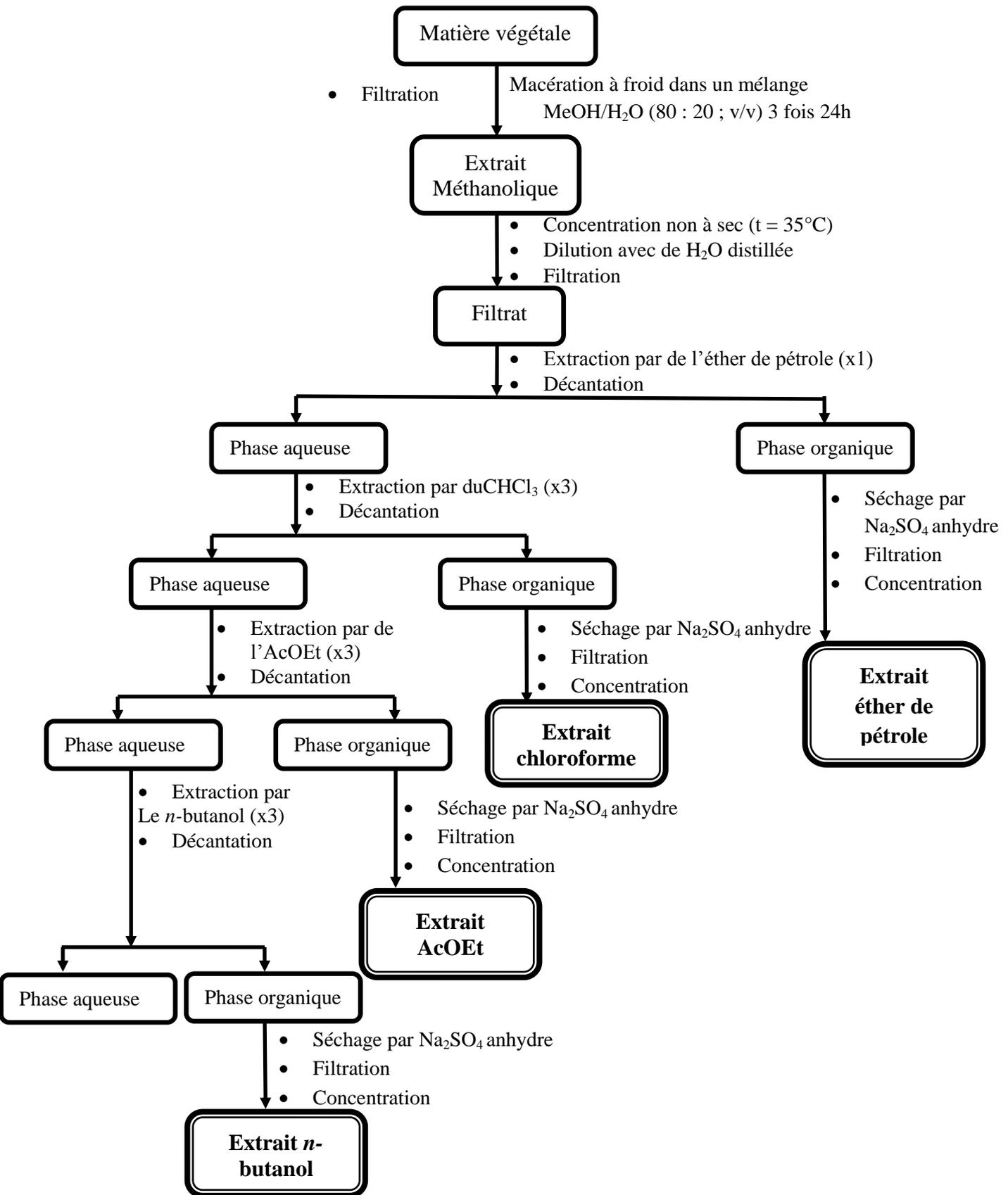


Figure III.12 : protocole d'extraction de *Pituranthos battandieri* Maire [1]

### III.6.4- Séparation chromatographique

Ce travail a été réalisé dans le cadre de thèse de doctorat de notre promotrice M<sup>me</sup> Esseid chahrazed [1].

#### Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme des parties aériennes

##### ➤ Séparation sur colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduits à utiliser comme système d'élution hexane/acétate d'éthyle/acétone en gradient de polarité. Une masse d'environ 15 g d'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'hexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système hexane/acétate d'éthyle/acétone en commençant par le mélange acétate d'éthyle/hexane (5:95) et en terminant par de l'acétone pur avec un fractionnement tous les 25 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C.

### III.6.5- Etude des fractions sélectionnées (Travail personnel)

#### III.6.5.1- Etude de la fraction CF12

Ces travaux ont débuté par la recherche du meilleur système d'élution sur plaque CCM analytique de gel de silice. Après plusieurs tests, nous avons opté pour le système éther de pétrole/chloroforme (2:8). Après élution par ce système et révélation de la plaque sous lumière UV (365 nm), Nous avons remarqué que notre fraction renferme un composé majoritaire facilement séparable (Figure III.13).

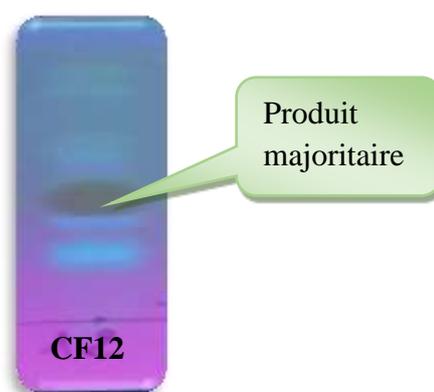


Figure III.13 : Profil chromatographique de la CF12

Nous avons alors retenu le système d'élution acétate d'éthyle/ cyclohexane (1:9) pour une séparation sur colonne de gel de silice avec une élution isocratique. Ainsi, une masse de 73,3 mg de la fraction CF12 mélangée avec quelques grammes de phase stationnaire est déposée sur une colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merk), préparée avec 5g de gel de silice dans le mélange d'élution. L'élution est donc réalisée avec le système acétate d'éthyle/ cyclohexane (1:9) du début jusqu'à la fin avec un fractionnement tous les 5 ml. Le suivi de l'évolution de cette colonne est réalisé par une étude sur des plaques CCM analytique (Figure III.14). Ces plaques sont visualisées sous lumière UV (365 nm) puis révélées par l'ammoniaque. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III.2.

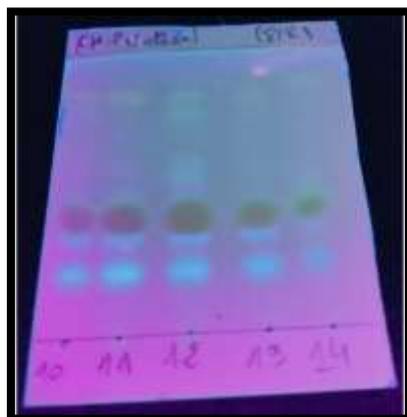


**Figure III.14 :** Colonne chromatographique de la CF12

**Tableau III.2 :** Regroupements des sous fractions issues de la colonne chromatographique de la fraction CF12

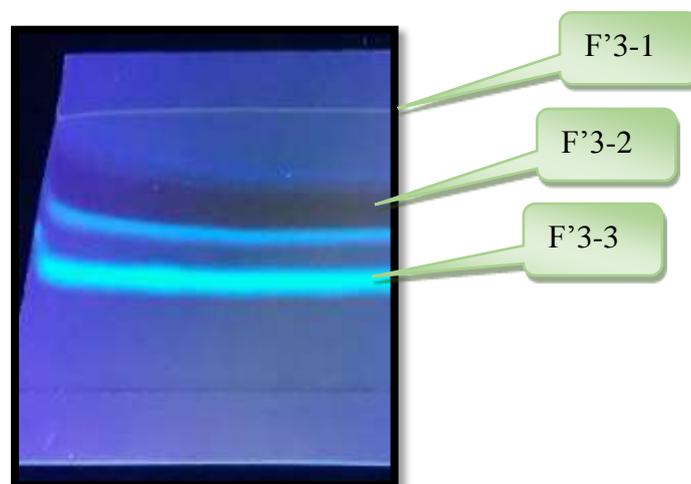
Lots de tubes rassemblés	N° des sous fractions	Masse (mg)	Observations
f <sub>1</sub> -f <sub>4</sub> (tube 1 au tube 4)	F' <sub>1</sub>	2,4	Des traces
f <sub>5</sub> -f <sub>9</sub> (tube 5 au tube 9)	F' <sub>2</sub>	10,2	Mélange séparable
F <sub>10</sub> -f <sub>14</sub> (tube 10 au tube 14)	F' <sub>3</sub>	20,7	Mélange séparable (fluorescence noire)
f <sub>15</sub> -f <sub>24</sub> (tube 15 au tube 24)	F' <sub>4</sub>	30,4	Mélange complexe

Les tubes 10 au tube 14 sont similaires, nous les rassemblait dans la sous fraction F'3 (Figure 15).



**Figure III.15** : plaque chromatographique des tubes f<sub>10</sub>-f<sub>14</sub> sous la lampe de WOOD (365nm)

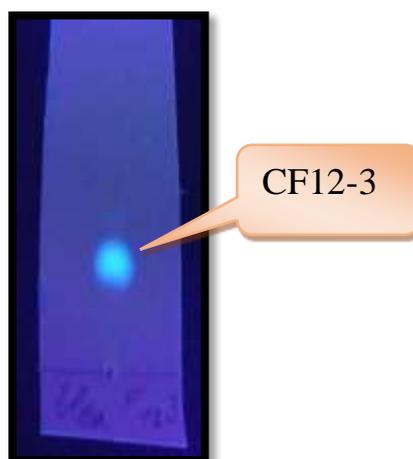
Après étude de la composition des quatre sous-fractions par CCM sur plaque analytique, nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail, à la sous-fraction F'3 à cause de la simplicité de sa composition. En effet, le profil chromatographique de F'3 montre trois taches uniquement avec une intensité plus marquée pour la deuxième bande. (Figure III.16).



**Figure III.16** : Profil chromatographique de la sous-fraction F'3

Ainsi, cette sous-fraction F'3 a été purifiée sur plaques CCM analytique de gel de silice éluées par le système éther de pétrole/CHCl<sub>3</sub> (2:8). Après trois éluations successives, le produit **F'3-3** (4 mg) a été obtenu à l'état pur et natif. Ce produit apparait sous la lumière de Wood (365 nm) sous forme d'une tache unique de couleur bleu fluorescent (Figure III.17). Nous reportons ce produit sous le code **CF12-3**.

La quantité de ce composé séparé n'est pas suffisante pour faire l'identification.



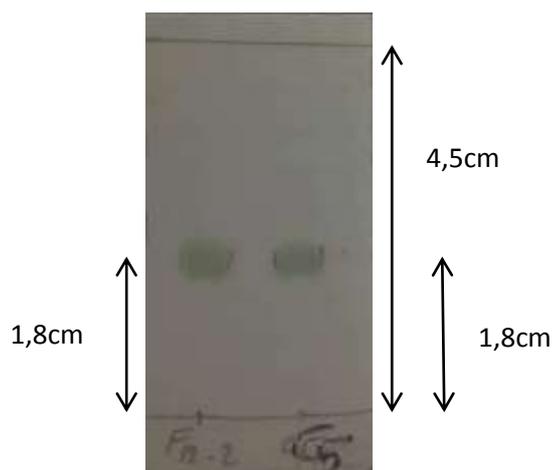
**Figure III.17 :** Plaque CCM analytique du produit **CF12-3** sous le lompe UV-vis à 365 nm

La tâche la plus intense représente le produit **F'3-2** apparait sous la lumière de Wood (365 nm) sous forme d'une tache noire, ce produit n'est pas vraiment pur, il contient des traces des impuretés, il subit à une autre purification par la recristallisation dans l'éthanol, pour donner le composé **F'3-2** (20 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **CF12-2** (Figure III.18).



**Figure III.18 :** Plaque CCM analytique du produit **CF12-2** sous la lumière de Wood

Après analyse chromatographique de ce composé **CF12-2** et par la comparaison des rapports frontaux calculés des produits isolés, il est apparait que notre produit était identique au composé **C5** qui a été séparé auparavant de la fraction **CF11** par notre promotrice dans son projet de doctorat (Figure III.19).



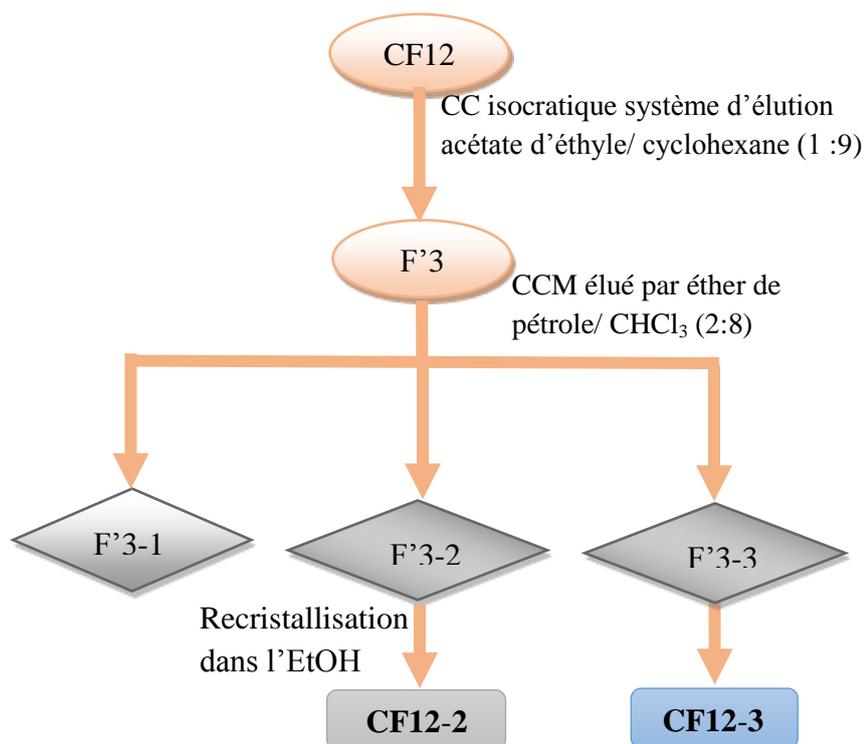
**Figure III.19 :** Plaque CCM analytique des produits **CF12-2** et **C5**

**Facteur de rétention des produits isolés :**

$$R_f (\text{CF12-2}) = 1,8 / 4,5 = 0,4$$

$$R_f (\text{C5}) = 1,8 / 4,5 = 0,4$$

Le schéma suivant (Figure III.20) résume l'ensemble des étapes suivies lors de l'étude de la fraction CF12.



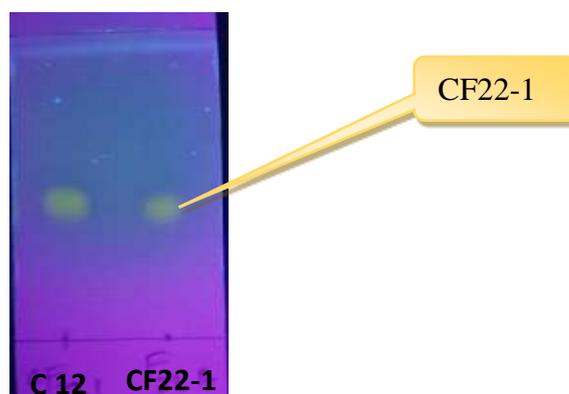
**Figure III.20 :** Etapes suivies lors de l'étude de la fraction CF12

**III.6.5.2- Etude de la fraction CF22**

La recristallisation de la fraction **CF22** (564,3 mg) dans un mélange EtOH/CHCl<sub>3</sub>, a permis d'isoler un produit sous forme de cristaux (aiguilles jaunes) (Figure III.21). Après plusieurs lavages avec de l'EtOH, la masse du produit pur **CF22-1** obtenu est de 40 mg, sa coloration sur plaque CCM sous la lumière de Wood (365 nm) est jaune (Figure III.22).

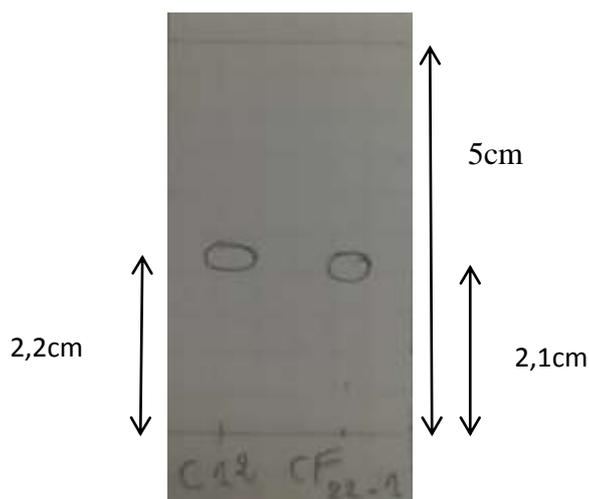


**Figure III.21** : les cristaux jaunes du produit **CF22-1**



**Figure III.22** : Plaque CCM analytique du produit **CF22-1** sous lumière de Wood

L'examen par chromatographie sur couche mince et le calcul de  $R_f$  de ce produit majoritaire **CF22-1** montrent qu'il est identique à **C12** déjà isolé à partir de la fraction CF20 de l'extrait chloroformique par notre promotrice (Figure III.23).



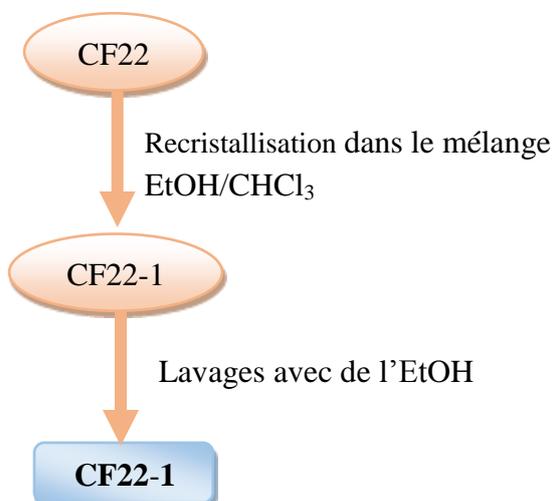
**Figure III.23 :** Plaque CCM analytique des produits **CF22-1** et **C12**

**Facteur de rétention des produits isolés :**

$$R_f(\text{CF22-1}) = 2,1 / 5 = 0,42$$

$$R_f(\text{C12}) = 2,2 / 5 = 0,44$$

Le schéma suivant (Figure III.24) résume l'ensemble des étapes suivies lors de l'étude de la fraction CF22.



**Figure III.24:** Etapes suivies lors de l'étude de la fraction CF22

### III.7- Etude biologique de *Pituranthos battandieri* Maire

#### III.7.1- Activités biologiques

La présente étude a porté sur l'évaluation des activités biologiques des extraits *n*-butanol AcOEt et  $\text{CHCl}_3$  et les deux produits **F12-2** et **F22-1** qui sont séparés de la phase chloroformique des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire (BEPB), Qui

appartient à la famille des Apiacées, une des familles les plus importantes de la flore saharienne algérienne, une espèce que nous avons sélectionnée pour étude.

### **Introduction**

Les espèces réactives oxygénées (ROS) produites en continu dans des cellules humaines pourraient induire un stress oxydatif provoquant la mort cellulaire par un dommage macromoléculaire [11,12]. Les acides gras polyinsaturés sont les plus sensibles aux ROS, conduisant à la peroxydation lipidique qui est probablement une étape cruciale dans la pathogenèse de plusieurs états pathologiques [13,14]. La peroxydation des lipides pourrait conduire à la perte de structure et au fonctionnement des membranes et à la génération de produits finis cytotoxiques et mutagènes qui peuvent étaler les réactions oxydatives et causer des dégâts supplémentaires [15,16]. Les globules rouges (RBCs) sont considérés comme des cibles principales pour l'attaque de radicaux libres en raison de la présence d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés, le stress oxydatif sur le RBC est impliqué dans l'hémolyse qui se manifeste dans une variété de pathologie [17,18]. L'hémolyse qui se réfère à la destruction d'érythrocytes avec libération de l'hémoglobine dans le plasma, se produit dans diverses conditions pathologiques [19]. Un certain nombre de plantes, telles que *Hibiscus esculentus* [20], *Allium paradoxum* [21], *Ugnimolinae Turcz* [22], *Wrightia tinctoria* [23] ont montré des propriétés anti-anémiques en raison de la présence de divers flavonoïdes. Les composés antioxydants naturels comme les flavonoïdes et les coumarines ont été proposés comme une approche efficace pour la prévention et le traitement de multiples troubles de la RBC par des radicaux libres ou d'un effet de lubrification des peroxydes lipidiques [24-26]. Sachant que des espèces du genre *Pituranthos* sont connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle [27,28], notre étude est orientée sur la recherche de sources naturelles algériennes d'antioxydants et notamment l'étude de *Pituranthos battandieri* Maire.

Dans ce sens, nos travaux ont porté sur la recherche de l'activité antioxydante in vitro des extraites des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. (BEPB). Les travaux de recherche de l'activité antioxydante ont été effectués par la méthode de l'effet scavenger du radical DPPH et l'acide de folin.

**III.7.1.1- Activité antioxydant**

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire [29].

**➤ Définition****• Un antioxydant**

Un antioxydant est une substance capable de prévenir, réduire ou réparer des dégâts occasionnés par les radicaux libres. Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire [30]. Chaque antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre [31]. Une bonne santé résulte d'un bon équilibre entre la production inéluctable de radicaux libres et l'action des antioxydants. Si un déséquilibre intervient, il aura des conséquences plus au moins graves sur la santé [32].

**• Les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des composés instables surtout formés d'oxygène. Ils sont générés au cours du fonctionnement normal, mais leur production peut être augmentée par la pollution, la fumée de cigarettes ou une exposition prolongée au soleil, par exemple. Leur structure chimique fait qu'ils endommagent les autres atomes en les « oxydant ». Ils sont toutefois plus ou moins tenus en échec par les antioxydants naturels de l'organisme. Certains facteurs peuvent toutefois rompre cet équilibre. Si les radicaux libres en viennent à excéder la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils peuvent contribuer à l'apparition de plusieurs maladies, dont les maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et d'autres maladies associées au vieillissement [33].

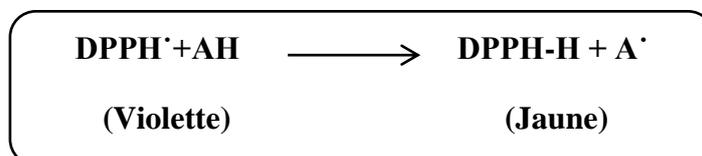
**• Le stress oxydatif**

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants [34], que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes anti oxydantes [35] ou une surproduction des radicaux libres [36].

**A) Test DPPH****➤ Principe**

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en

contact d'antioxydants, ce qui explique la disparation de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'extrait de plante à piéger ce radical qu'on peut détecter par spectrophotométrie.



#### ➤ Mode opératoire

L'activité antiradicalaire des extraits de l'espèce Apiacées a été évaluée en utilisant la méthode du DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

#### • Préparation de la DPPH

Dissoudre 3 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de éthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol. L'absorbance est environs (0.7-0.9) nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

#### • Préparation des extraits

Tous les extraits ont été préparés dans le éthanol avec une concentration de 1 mg/ml (2 mg de l'extrait avec 2 ml de l'éthanol).

Ensuite, dans les tubes on a remplir 400 µl de chacun de ces solutions ont été ajoutés à 1600 de la solution de DPPH, Le contrôle négatif et préparé en parallèle en mélangeant 400µl de éthanol avec 1600µl de la solution du DPPH à la même concentration. Après 30 min d'incubation dans une chambre noire à température ambiante, la lecture de l'absorbance est effectuée à 517 nm par UV-visible spectrophotomètre.

#### ➤ L'expression des résultats

En présence d'un antioxydant la d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stoechiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés.

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (% PI) en utilisant suivant :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A \text{ control} - A \text{ échantillon}) / A \text{ control}] \times 100$$

**A control** : Absorbance du control (1600 µl de DPPH+ 400 µl de éthanol).

**A échantillon** : Absorbance de l'échantillon ou standard.

La valeur IC<sub>50</sub> est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50% d'inhibition.

### **B) Dosage des polyphénols TPC**

La teneur en phénols totaux des différents extraits de la plante peuvent être analysé par plusieurs méthodes. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisé.

#### **➤ Principe**

Cette méthode est basée sur l'interaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin Ciocalteu qui est un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>4</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>4</sub>), en oxydant les composés phénoliques, ce réactif est réduit en un mélange d'oxyde de tungstène (W<sub>2</sub>PW<sub>23</sub>) et d'oxyde de molybdène (MO<sub>8</sub>O<sub>23</sub>).

Ces produits ont une couleur bleu, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents de l'échantillon.

#### **➤ Mode opératoire**

##### **• Préparation de folin**

Un volume de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté 9ml l'eau distillée.

##### **• Préparation de solution de carbonate de sodium**

Dans une fiole en a introduit 7.5 g dans 100 mL d'eau distillée.

#### **➤ Méthodologie**

Nous avons utilisé le protocole [8] avec quelques modifications. A l'aide d'une micropipette, on introduit un volume de 200µl d'extraits dissous dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml dans des tubes à essai avec 1000 µl de réactif de Folin-Ciocalteu. On mélange bien et on laisse reposer pendant 4 min. On ajoute au mélange précédent 800µl d'une solution de carbonate de sodium agite manuellement et on laisse incuber durant 2h à la température ambiante. L'absorbance de la solution est mesurée à 765nm contre un blanc à l'aide d'une UV-visible. La courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide gallique comme un standard par la même méthode et dans les mêmes conditions opératoire. Le test est répété deux fois pour chaque extrait.

Le taux de composés phénolique est détermine par la loi suivant :

$$T=(C \times V) / M$$

**T** : Taux des composés phénoliques.

**C** : Concentration d'extrait équivalent.

**V** : Volume d'extrait (ml).

**M** : Poids sec d'extrait (g).

### Conclusion

Au cours de cette investigation que nous avons effectuée par chromatographie, nous avons pu mettre à profit toutes nos connaissances sur les méthodes de séparation et notamment les techniques de chromatographie liquide. Ces travaux expérimentaux de séparation et de purification nous ont menés à l'obtention de trois produits à l'état pur et natif.

**Références bibliographiques**

- [1] Esseid C, Leon F, Mosset P, Benayache S, Marchioni E, Brouard I, Benayache F. Coumarins and other constituents from *Deverra battandieri*. *Phytochemistry Letters*. 2020 ; 1874-1879.
- [2] Esseid C. Hamadou MH. Ameddah S. Menad A. León F. Brouard I. Marchioni E. Benayache S. Benayache F ; Chemical constituents and antioxidant activity of a polar extract from *Pituranthos battandieri* Maire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2017 ; 9(4) ; 559-566.
- [3] Esseid C. Mechehoud Y. Chalchat JC. Figueredo G. Benayache S. Benayache F ; Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Pituranthos battandieri* Maire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2016 ; 8(10) ; 1731-1734.
- [4] Imad Mennai, Ines Sifaoui, Chahrazed Esseid, Atteneri Lopez-Arencibia, María Reyes-Batlle, Fadila Benayache, Samir Benayache, Isabel L. Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, José E. Pinero, Ignacio A. Jiménez. Bio-guided isolation of leishmanicidal and trypanocidal constituents from *Pituranthos battandieri* aerial parts. *Parasitology International* 2021 ; 1383-1388.
- [5] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*. 2006 ; 160 : 1-40.
- [6] Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress : Adaptation, damage, repair, senescence and death. In free radicals in biology and medicine, 4 th ed. London : Oxford, university press. 2007 ; pp. 187-267.
- [7] Bakirel T, Bakirel U, Keles OU, Ulgen SG, Yardibi H. In vivo assessment of anti-diabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in all oxaninduced diabetic rabbits. *J. Ethno pharmacol*. 2008 ; 116 (1) : 64-73.
- [8] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci*. 2008 ; 4(2) : 89-96.
- [9] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an over view. *Methods Enzymol*. 1990 ; 186 : 1-85.
- [10] Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int*. 2006 ; 30 : 376-380.

- [11] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact.* 2006 ; 160 : 1-40.
- [12] Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress : Adaptation, damage, repair, senescence and death. In *free radicals in biology and medicine*, 4 th ed. London : Oxford, university press. 2007 ; pp. 187-267.
- [13] Bakirel T, Bakirel U, Keles OU, Ulgen SG, Yardibi H. In vivo assessment of anti-diabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in all oxaninduced diabetic rabbits. *J. Ethno pharmacol.* 2008 ; 116 (1) : 64-73.
- [14] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008 ; 4(2) : 89-96.
- [15] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an over view. *Methods Enzymol.* 1990 ; 186 : 1-85.
- [16] Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int.* 2006 ; 30 : 376-380.
- [17] Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.* 2008 ; 390(1) : 1-11.
- [18] Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 1986 ; 107 : 401-404.
- [19] Hatherill JR, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions.* 1991 ; 32 : 351-358.
- [20] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* leaves. *Pharmacology online (PhOL).* 2009 ; 2 : 1097-1105.
- [21] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Cent Eur J Biol.* 2010 ; 5 : 338-345.
- [22] Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food chem. toxicol.* 2007; 45: 130-135.
- [23] Bigoniya P, Singh S, Singh CS, Shukla A. Anti-anemic potential estimation on mice and characterization of flavonoids using high performance thin layer chromatography in *Wrightia tinctoria* bark fraction. *J. Nat. Pharm.* 2013; 4: 47-56.
- [24] Asgary S, Naderi GH, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals, *Exp. Clin. Cardiol.* 2005; 10 (2), 88.

- [25] Singh N, Rajini PS. Antioxidant in erythrocytes against oxidative damage, Chem. Biol. Interact. 2008; 173: 97-104.
- [26] Girish TK, Vasudevaraju PU, Prasada Rao J. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. Food Chem Toxicol. 2012; 50 (5): 1690-16962.
- [27] Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central sahara : Pharmacopoeia of Tassili n'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105 (3) : 358-367.
- [28] Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. Fleurs du sahara. Voyage ethnobotanique avec les touaregs du Tassili. Ed. Ibis press, Paris ; 2000.
- [29] Cao, G., Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clinical Chemistry, 44(6), 1309- 1315.
- [30] Edeas M. : Les secrets de santé du thé, c'est naturel, c'est ma santé, Ed,Alpen Editions s.a.m. p88, (2005).
- [31] Camilleri.J.P. ; Snoussi.A. : L'éternelle jeunesse : L'art de bien vieillir, Ed, L'Harmattan, p137, (2012).
- [32] Beier, B.-A.; Chase, M.; Thulin, M., Phylogenetic relationships and taxonomy of subfamily Zygothylloideae (Zygothylaceae) based on molecular and morphological data. Plant Systematics and Evolution 2003, 240, 11-39.
- [33] Mothana, R. A.; Mentel, R.; Reiss, C.; Lindequist, U., Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from the island Soqotra. Phytotherapy research 2006, 20, 298-302.
- [34] Albalawi, M. A. D.; Bashir, N. A. O.; Tawfik, A., Anticancer and Antifolate Activities of Extracts of Six Saudi Arabian Wild Plants Used in Folk Medicine. Journal of Life Sciences 2015, 9, 334-340.
- [35] Duke, J.A. (1983). Medicinal Plants in the Bible. Trado-Medic Books, New York, Chapter.28.
- [36] Benmehdi, H.; Behilil, A.; Memmou, F.; Amrouche, A. Free radical scavenging activity, kinetic behavior and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. Arab. J. Chem., 2017, 10, 1402-1408.



# *Partie*

## *Résultats et discussion*

## IV- Résultat et discussion

## IV.1- Résultat du screening phytochimique

Les résultats de l'ensemble de nos expérimentations de screening phytochimique sont résumés dans le tableau IV.1. Dans ce tableau les signe (+) et (-) indiquent la présence et l'absence de la classe de substances naturelles recherchées.

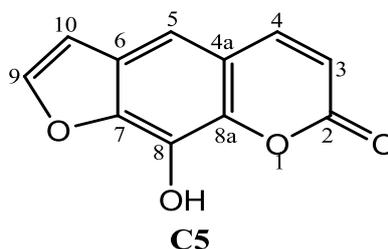
**Tableau IV.1 :** Résultat du screening phytochimique sur les différents métabolites secondaires de *P. battandieri* Maire

Classe de substances naturelles recherchée	Interprétation
Alcaloïdes	-
Coumarines	+
Stérols	-
Triterpènes	+
Terpènes	-
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	-
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	-
Quinones	-
Saponines	+
Anthraquinones	-

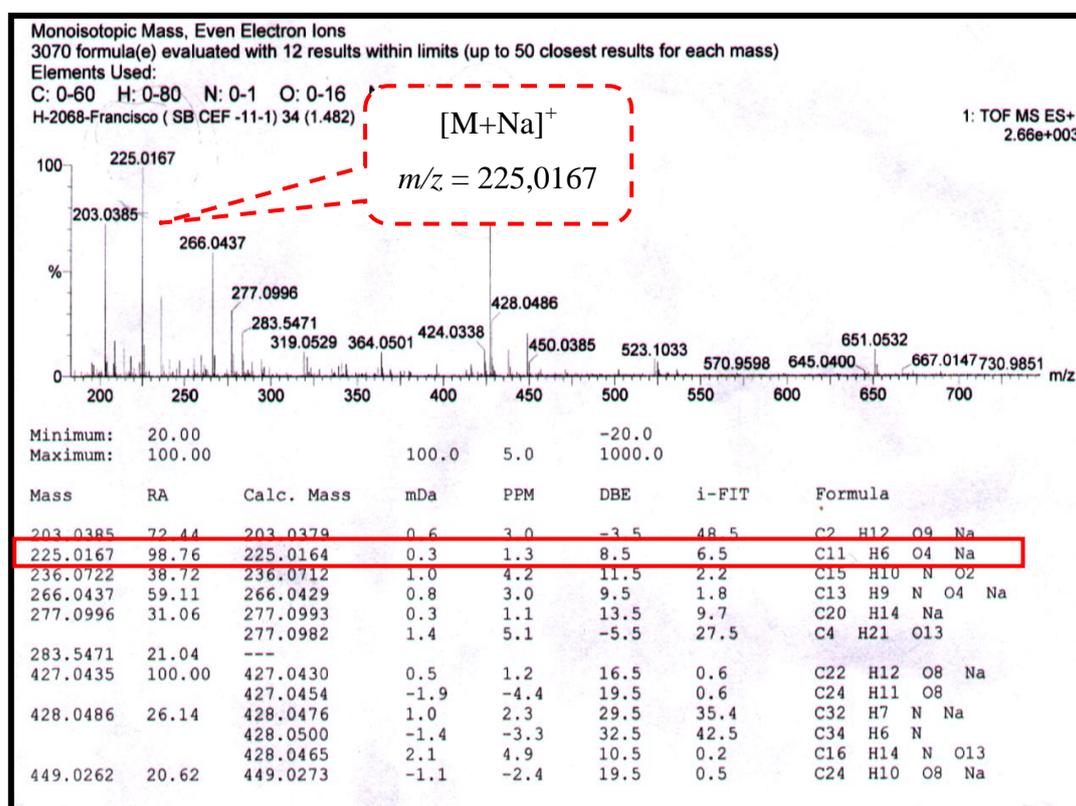
Ces travaux de screening phytochimique ont montré que les parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire accumulent les métabolites secondaires de type coumarine, triterpène, tanin catéchique, flavonoïde et saponine.

## IV.2- Elucidation structurale des produits isolés

## IV.2.1- Elucidation structurale du composé CF12-2 (C5)

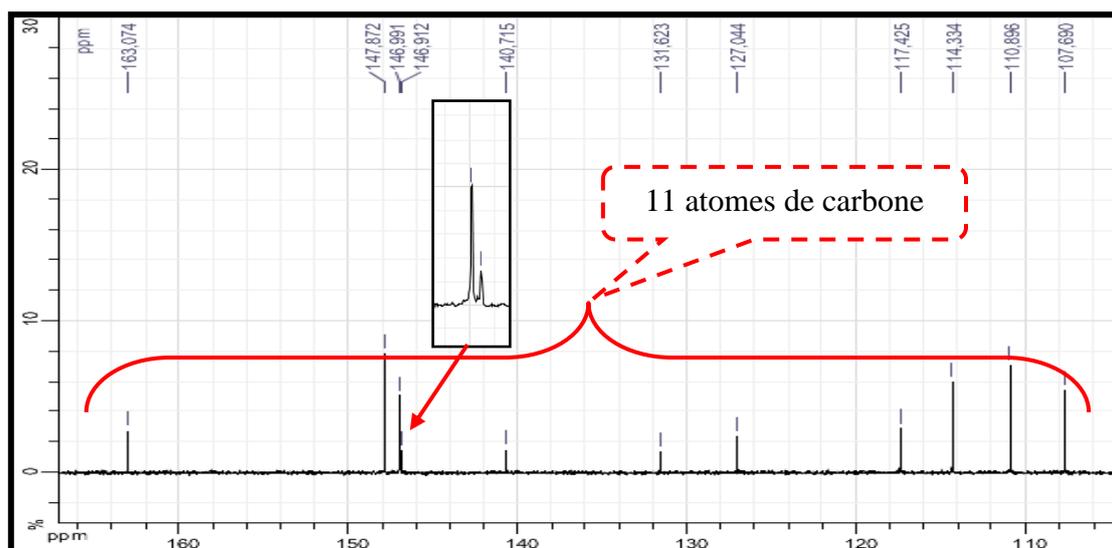


Le spectre de masse en mode HR-ESI(+) (Spectre IV.1) montre un pic quasi-moléculaire à  $m/z = 225,0167$  correspondant à la forme  $C_{11}H_6O_4Na$  calculée pour 225,0164 donnant une molécule de formule brute  $C_{11}H_6O_4$  et contenant neuf insaturations.



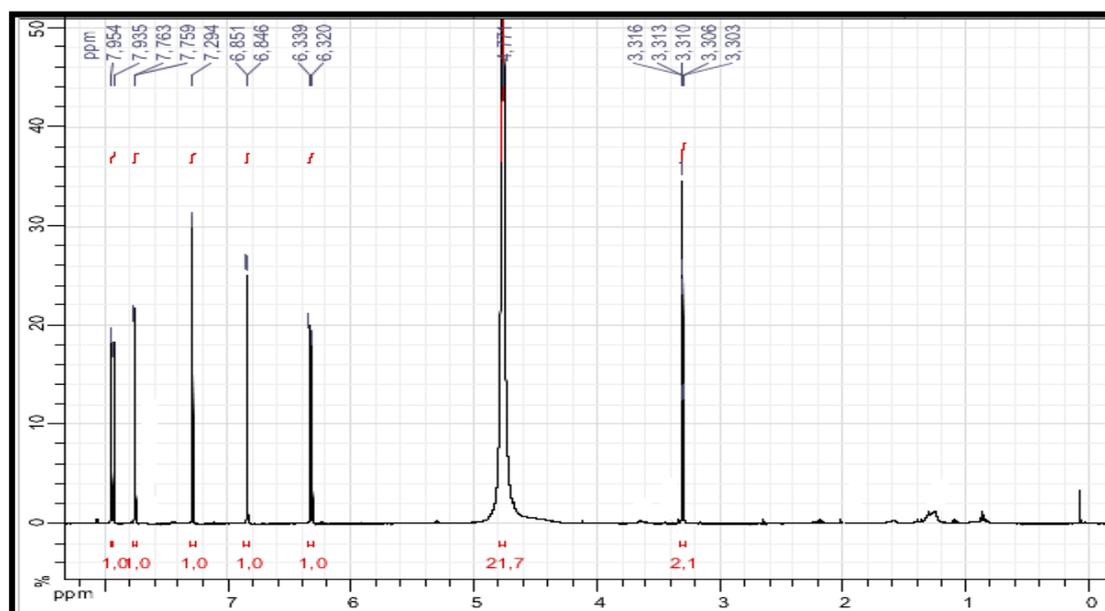
Spectre IV.1 : Données de la HR-ESI-MS (+) relatives du composé CF12-2

Le spectre RMN  $^{13}C$  (Spectre IV.2-1) confirme la présence de 11 atomes de carbone. Ces carbones admettent tous un déplacement chimique supérieur à 100 ppm.

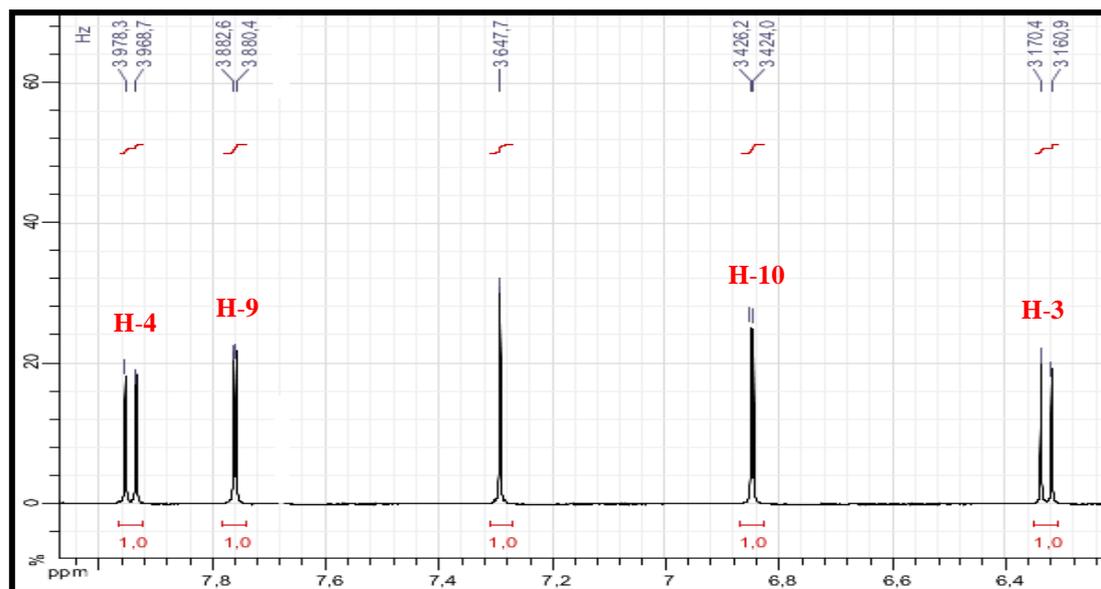


**Spectre IV.2-1** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2

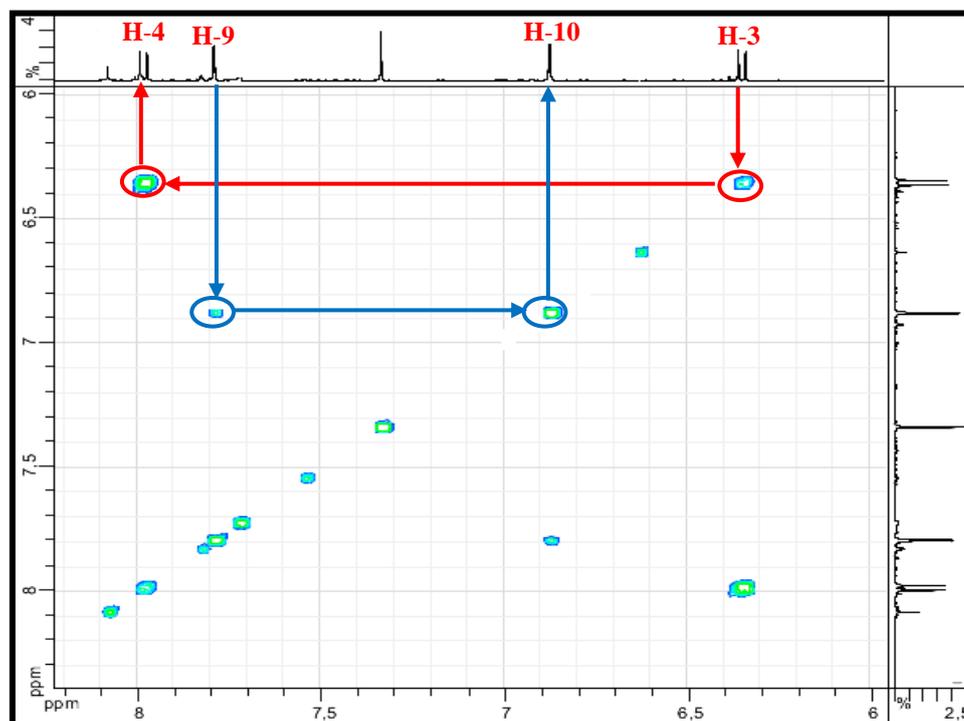
Le spectre proton (Spectre IV.3-2), montre la présence de deux systèmes AX caractéristiques d'un squelette de type furanocoumarine. Le premier à  $\delta_{\text{H}} = 6,32$  et  $7,94$  ppm ( $J = 9,6$  Hz), couplage confirmé par le spectre COSY (Spectre IV.4-1) est attribuable à H-3 et H-4, respectivement. Le deuxième à  $\delta_{\text{H}} = 6,84$  et  $7,76$  ppm ( $J = 2,2$  Hz) est attribuable à H-10 et H-9, respectivement. Le couplage vicinal de ces deux noyaux est également confirmé par le spectre COSY (Spectre IV.4-1 et Figure IV.1).



**Spectre IV.3-1** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2



Spectre IV. 3-2 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2



Spectre IV.4-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2

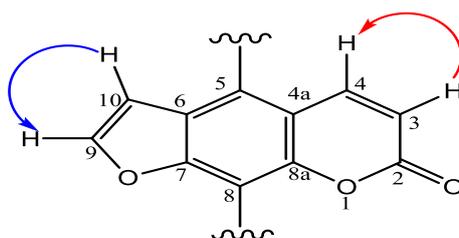
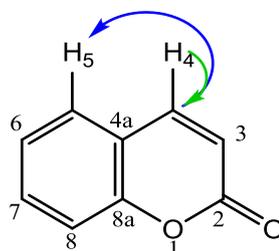
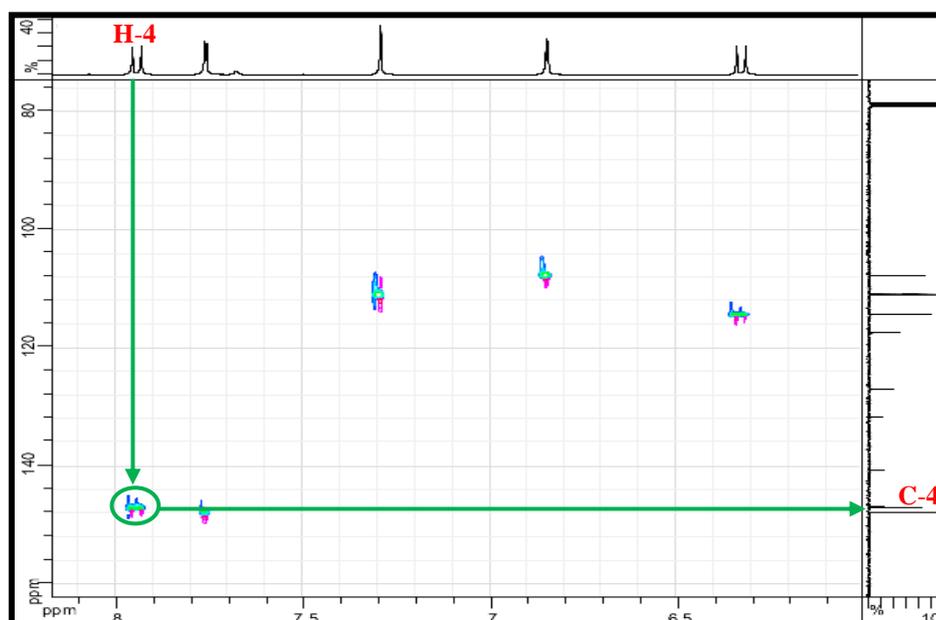


Figure IV.1 : Corrélations COSY observées pour la molécule CF12-2

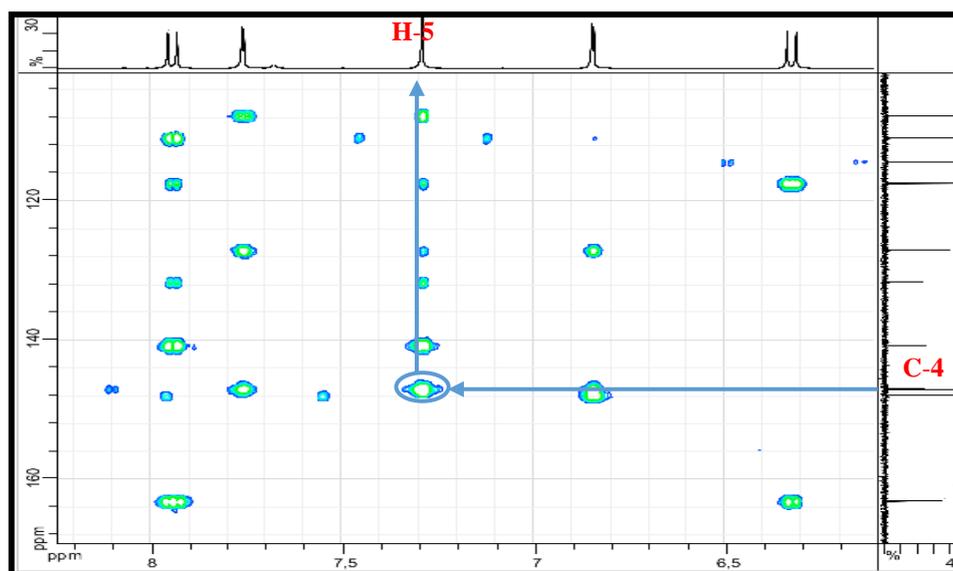
Le spectre HSQC (Spectre IV.5-1) permet de localiser le carbone C-4 à  $\delta_C = 146,99$  ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre IV.6-1), ce carbone C-4 montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 7,29$  ppm, ce proton ne peut donc être qu'en position C5 (figure IV.2).



**Figure IV.2** : Interactions HSQC (flèche verte) et HMBC (flèche bleue) observées pour la molécule CF12-2

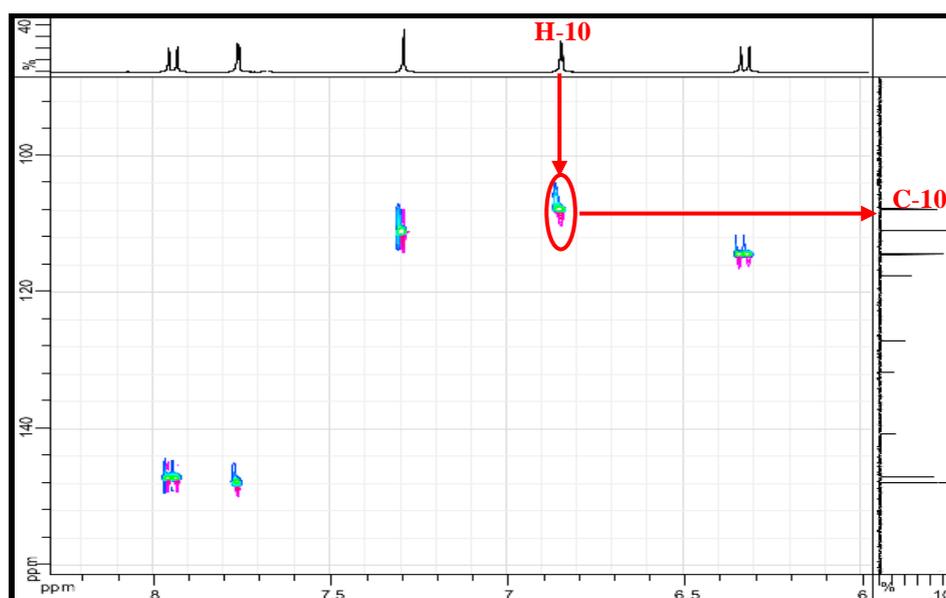


**Spectre IV.5-1** : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm) de CF12-2

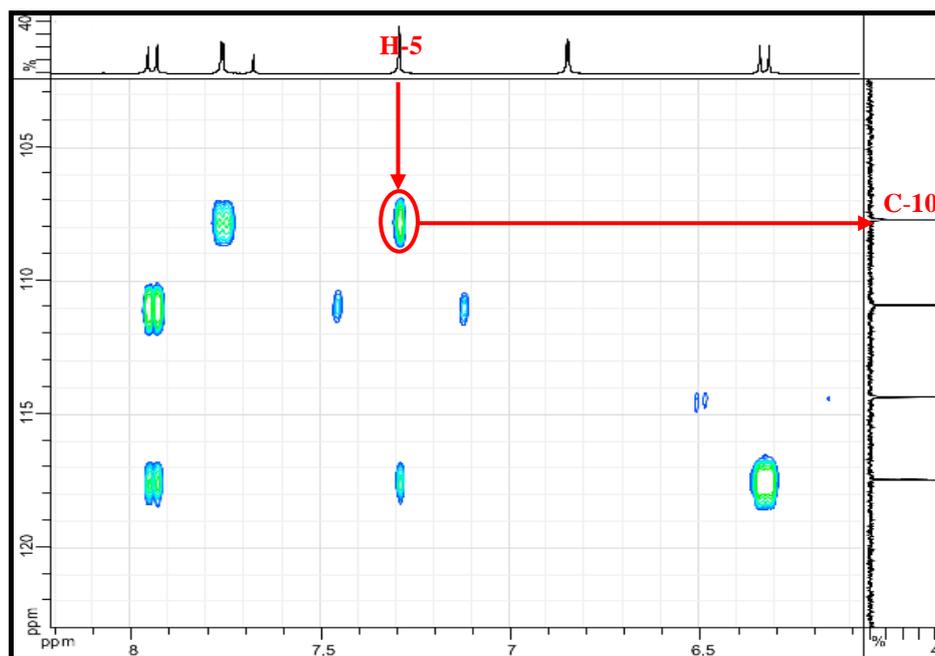


**Spectre IV.6-1** : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm) du composé CF12-2

L'examen du spectre HSQC (Spectre IV.5-2), permet la localisation de C-10 à  $\delta_C = 107,69$  ppm grâce à la corrélation observée entre ce carbone et le doublet à  $\delta_H = 6,84$  ppm (H-10). Sur le spectre HMBC (Spectre IV.6-2), ce carbone montre une tache de corrélation avec le proton H-5, ceci signifie que le carbone de ce CH se trouve à 3 liaisons de H-5. Cette donnée oriente donc vers une furanocoumarine linéaire soit un psoralène substitué en C-8. Sachant que d'après les données de la spectrométrie de masse, cette molécule admet une formule brute  $C_{11}H_6O_4$  il est donc évident que le substituant porté par le psoralène n'est autre qu'un groupement hydroxyle.

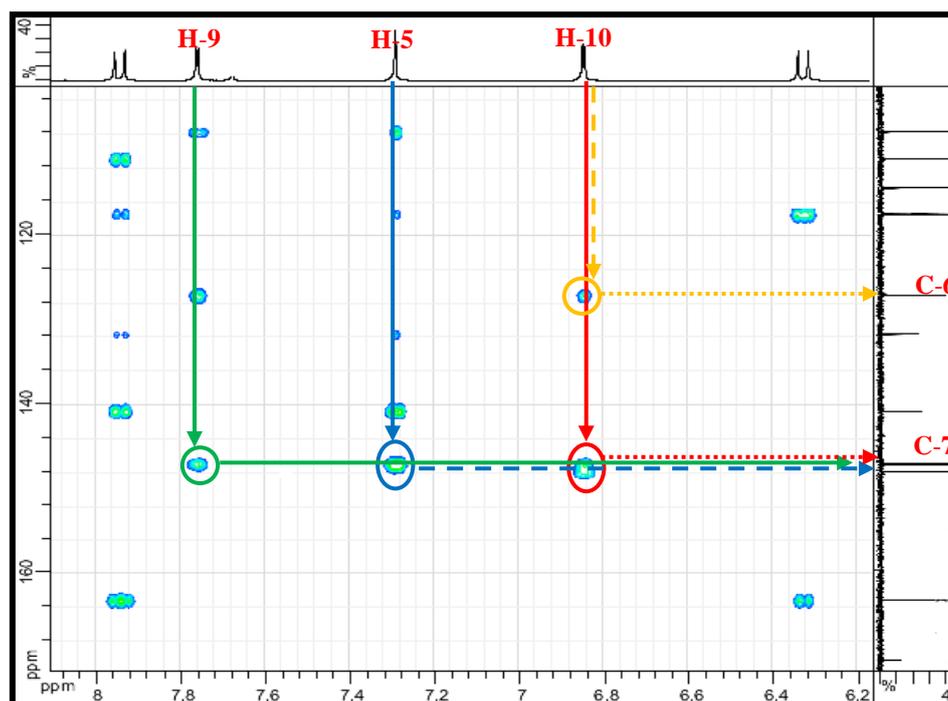


**Spectre IV.5-2** : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm) du produit CF12-2



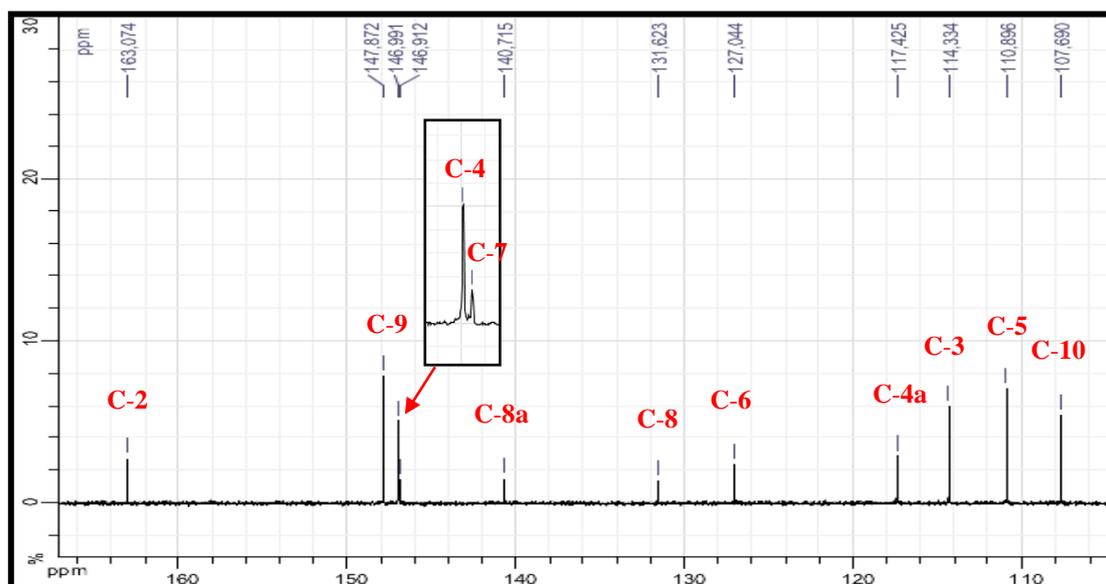
**Spectre IV.6-2** : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2

L'analyse combinée des spectres proton, HSQC et HMBC permet d'attribuer l'ensemble des signaux aux noyaux respectifs comme reporté dans le tableau IV.2 ; on relève en particulier sur le spectre HMBC (Spectre IV.6-3) que les protons H-5 et H-10 corrélient tous les deux avec le carbone aromatique oxygéné ( $\delta_c = 146,91$  ppm), ce carbone ne peut être que le C-7. Sur le même spectre HMBC, le proton H-9 permet la localisation de C-6 à  $\delta_c = 127,04$  ppm et montre une corrélation avec C-7, ceci n'est possible que si on a une liaison entre l'oxygène et le C-9 et donc un cycle furanique. Après attribution de l'ensemble des signaux du spectre carbone treize (Spectre IV.2-2), sur la base des analyses des spectres HSQC et HMBC (Tableau IV.2), il reste un carbone aromatique quaternaire résonant à  $\delta_c = 131,74$  ppm que nous pouvons attribuer sans ambiguïté au carbone de la position C-8 de la furanocoumarine. La valeur de son déplacement chimique est bien en faveur de son oxygénation.



Spectre IV.6-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2

Ainsi, cette molécule reportée dans la figure IV.2 est connue sous le nom de **xanthotoxol** (8-hydroxypsoralène). Elle a été isolée auparavant d'espèces de plusieurs familles [1].



Spectre IV.2-2 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (125 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF12-2

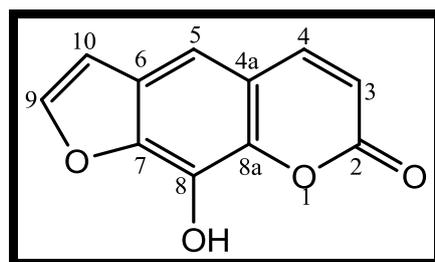


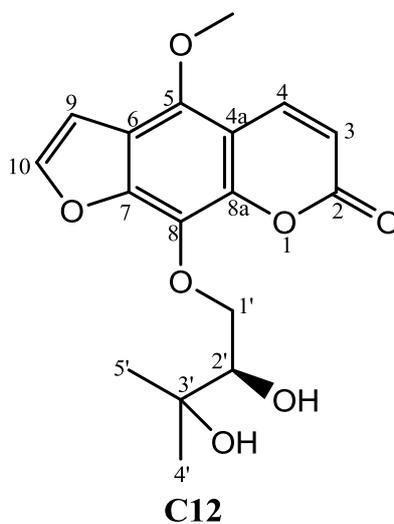
Figure IV.3 : Structure finale du composé CF12-2, xanthotoxol

Les données de la RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  sont rassemblées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : données des spectres RMN du composé CF12-2

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	163,07
3	6,32 ( $J = 9,6$ 1H $d$ )	114,33
4	7,94 ( $J = 9,6$ 1H $d$ )	146,99
4a	-	117,42
5	7,29 ( $s$ )	110,89
6	-	127,04
7	-	146,91
8	-	131,74
8a	-	141,02
9	7,76 ( $J = 2,2$ Hz 1H $d$ )	147,87
10	6,84 ( $J = 2,2$ Hz 1H $d$ )	107,69

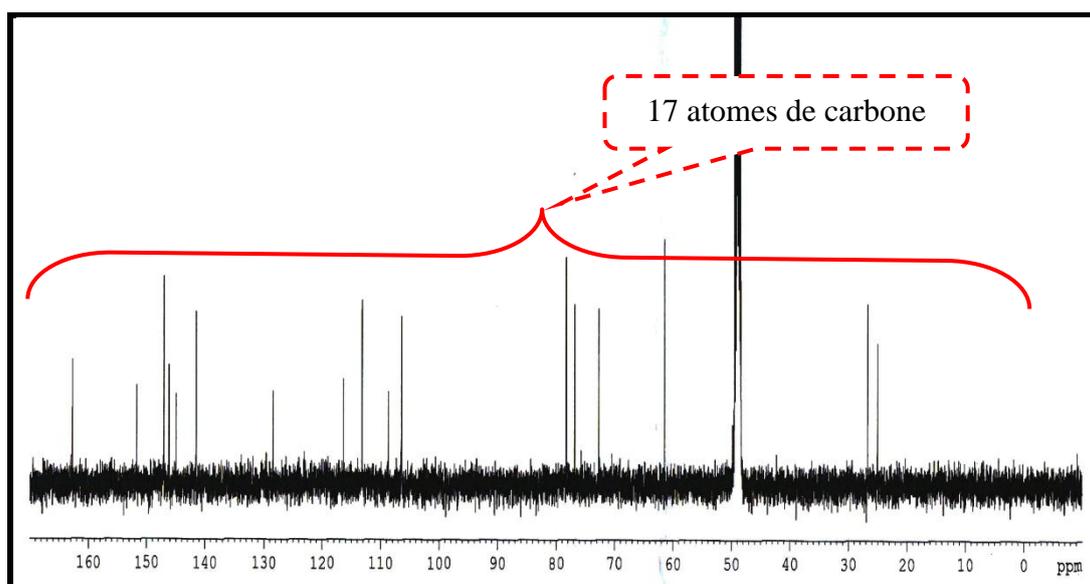
#### IV.2.2- Elucidation structurale du composé CF22-1 (C12)



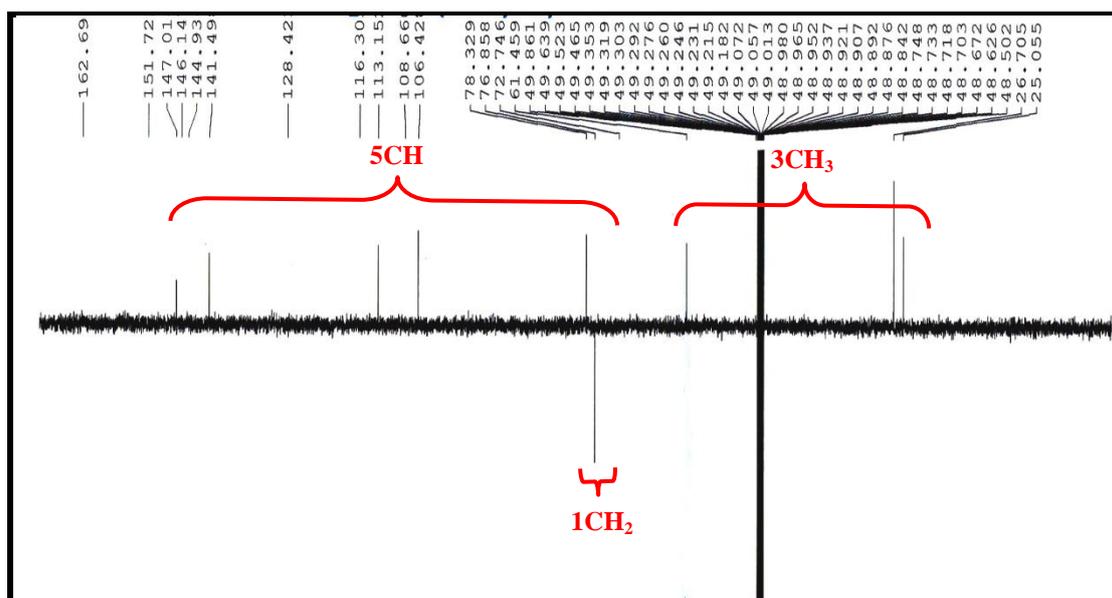
Le composé CF22-1 (C12) a été obtenu sous forme de cristaux jaunes.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre IV.7-1), met en évidence la présence de 17 atomes de carbone. L'analyse de ce spectre et celle du spectre DEPT  $135^\circ$  (Spectre IV.8), nous ont permis de distinguer :

- Huit carbones quaternaires dont 7 hybridés  $\text{sp}^2$  et 1 hybridé  $\text{sp}^3$  et oxygéné.
- Cinq groupements CH dont 4 hybridés  $\text{sp}^2$  et 1 hybridé  $\text{sp}^3$  et oxygéné.
- Un groupement  $\text{CH}_2$  hybridé  $\text{sp}^3$  et oxygéné.
- Trois groupements méthyles dont un méthoxy.

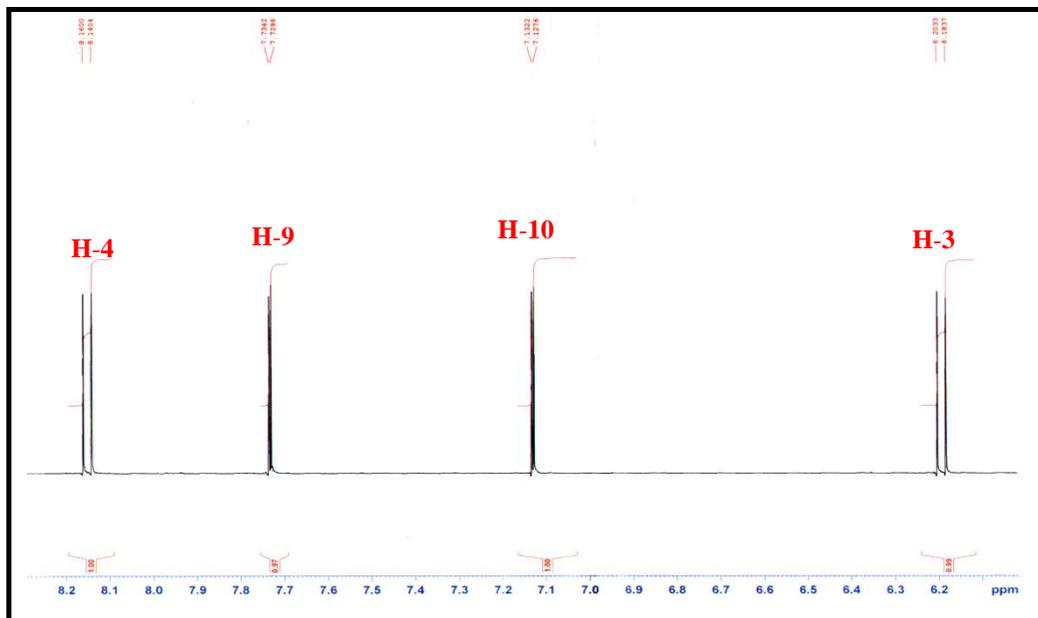


Spectre IV.7-1 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) de CF22-1

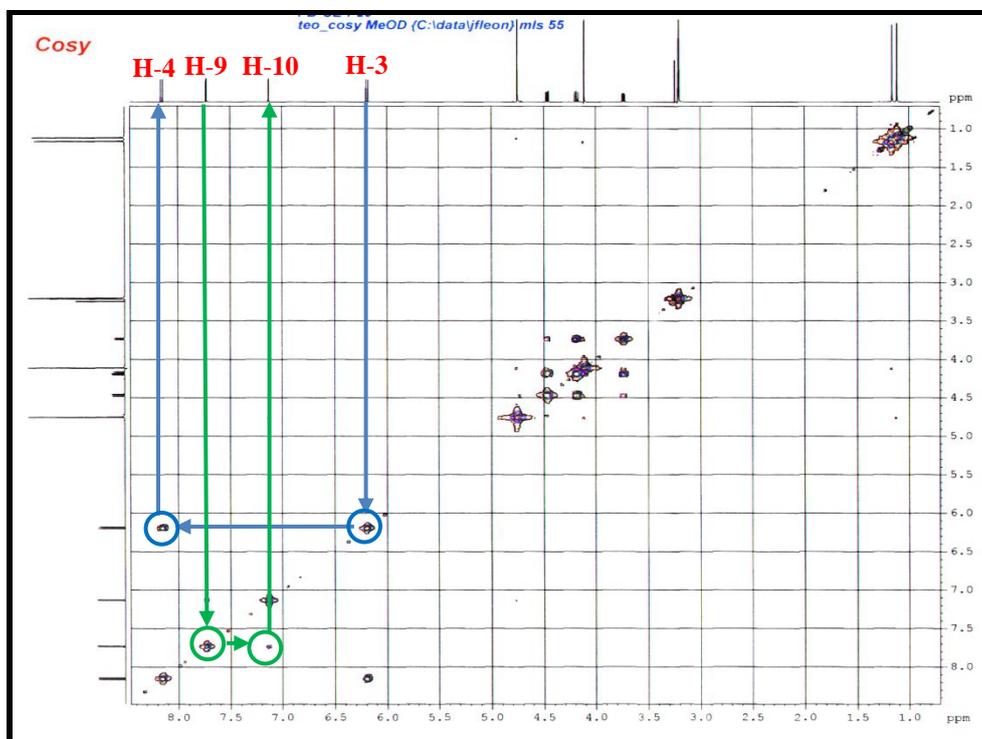


Spectre IV.8 : Spectre DEPT  $135^\circ$  étalé (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) de CF22-1

Le spectre RMN du proton (Spectre IV.9-1), et le spectre COSY (Spectre IV.10-1), de ce composé montrent des signaux caractéristiques du noyau psoralène (Tableau IV.3) disubstitué dans les positions C-5 et C-8.



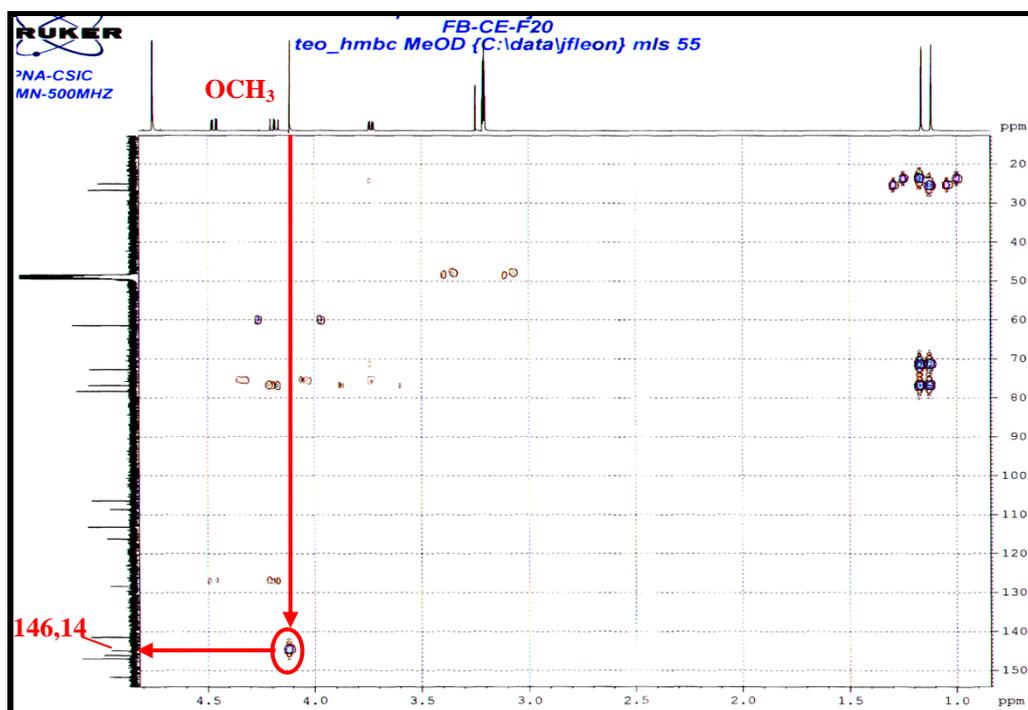
Spectre IV.9-1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1



Spectre IV.10-1 : Spectre COSY (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1

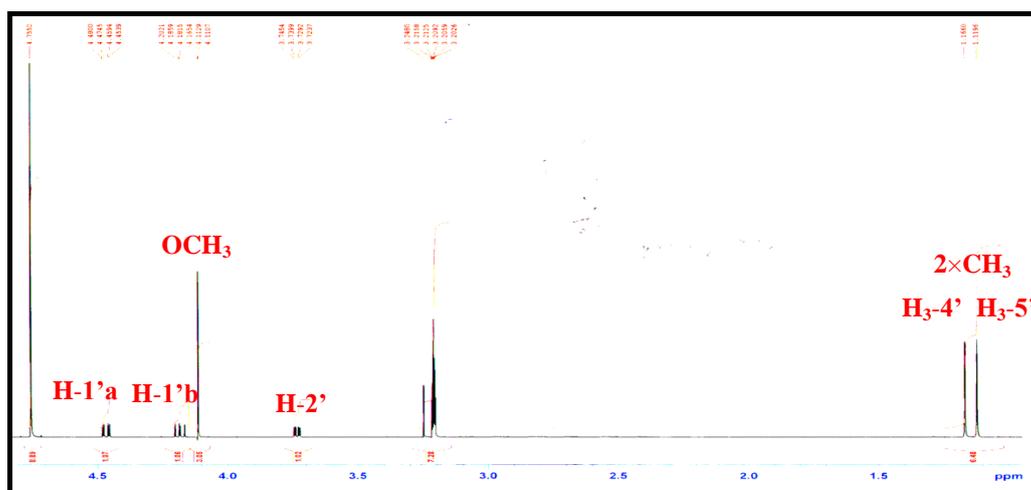
Sur le spectre proton (Spectre IV.9-2), on relève en premier lieu le groupement méthoxyle résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,11 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  61,46 ppm) dont les protons corrélient sur le spectre HMBC

(Spectre IV.11-1), au carbone quaternaire résonnant à  $\delta_C$  146,14 ppm signifiant que ce méthoxyle est porté par ce carbone quaternaire.



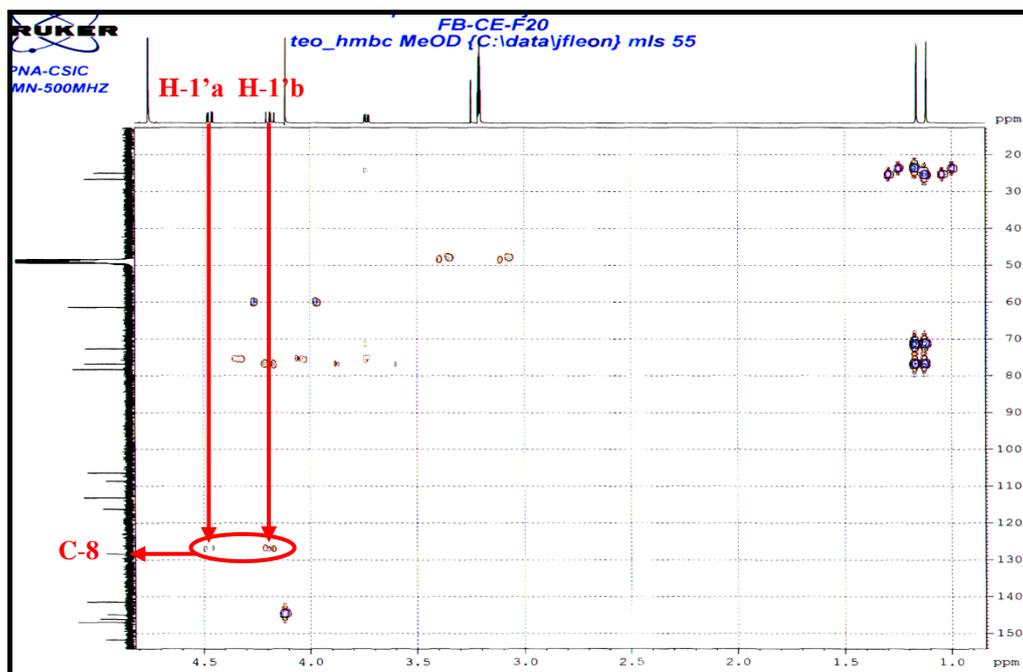
Spectre IV.11-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) de CF22-1

Concernant le deuxième substituant les résultats de l'analyse de l'ensemble des spectres de ce composé CF22-1 indiquent la présence d'un groupement prényloxy dioxygéné dans ses positions C-2 et C-3 que nous numérotions dans cette molécule C-2' et C-3'. Le carbone du groupement CH<sub>2</sub> de ce prényloxy sera numéroté C-1' et ses protons H-1'a et H-1'b.



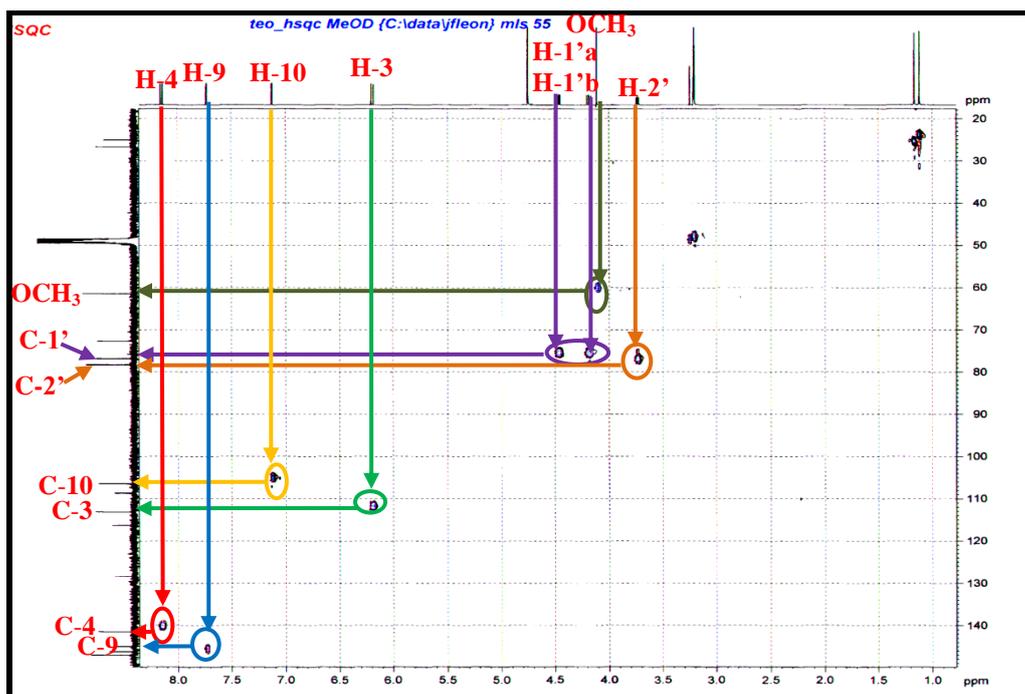
Spectre IV.9-2 : Spectre RMN <sup>1</sup>H étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) de CF22-1

Les protons H-1'a et H-1'b résonant sous forme de deux doublets dédoublés à  $\delta_H$  4,47 ( $J = 10,3 ; 2,8$  Hz) et  $\delta_H$  4,19 ppm ( $J = 10,3 ; 8,1$  Hz) ( $\delta_C$  76,86 ppm) corrélient sur le spectre HMBC (Spectre IV.11-2), avec le carbone obligatoirement porteur du groupement prényloxy dont le déplacement chimique est  $\delta_C$  128,42 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique bien qu'il s'agit de la position C-8 du noyau psoralène.



Spectre IV.11-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1

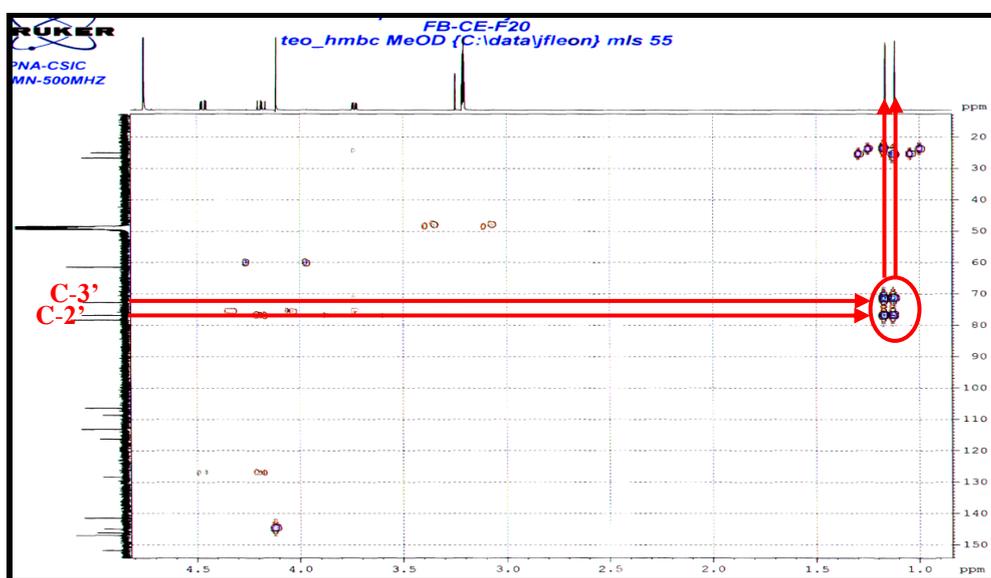
Ainsi, on peut donc placer le groupement méthoxyle décrit précédemment en position C-5 et par conséquent attribuer le carbone résonant à  $\delta_C$  146,14 ppm au C-5 du noyau psoralène. On peut signaler par ailleurs que H-2' résonne à  $\delta_H$  3,73 ppm ( $dd ; J = 8,1 ; 2,8$  Hz ;  $\delta_C$  78,33 ppm) et C-3' à  $\delta_C$  72,75 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux carbones confirment bien leur oxygénation.



**Spectre IV.12** : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1

Les carbones C-2' et C-3' corrélient sur le spectre HMBC (Spectre IV.11-3), avec les protons des deux méthyles résonant sous forme de deux singulets à  $\delta_H$  1,17 ppm ( $\delta_C$  26,70 ppm) et  $\delta_H$  1,12 ppm ( $\delta_C$  26,70 ppm) confirmant l'idée que ces méthyles sont portés par le carbone C-3'.

**H<sub>3</sub>-4' H<sub>3</sub>-5'**



**Spectre IV.11-3** : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1

A ce stade de notre analyse, il est clair que nous avons utilisé tous les atomes de carbone (17 carbones car 17 signaux trouvés sur le spectre  $^{13}\text{C}$  totalement découplé), tous les atomes d'hydrogène déduits des intégrales des signaux et/ou du type des groupements hydrocarbonés présents dans la molécule (16 protons). Nous avons également 4 atomes d'oxygène dans le

noyau psoralène en tenant compte de celui en C-8 et deux autres dans deux fonctions hydroxyles

en positions C-2' et C-3'. Alors notre composé est un diol et qu'il admet comme formule brute  $C_{17}H_{18}O_7$ . Les résultats de cette analyse structurale convergent vers la **5-méthoxy-8-(2',3'-dihydroxyprényloxy) psoralène** (Figure IV.4). Cette molécule est connue sous le nom de **byakangelicine** [2-4].

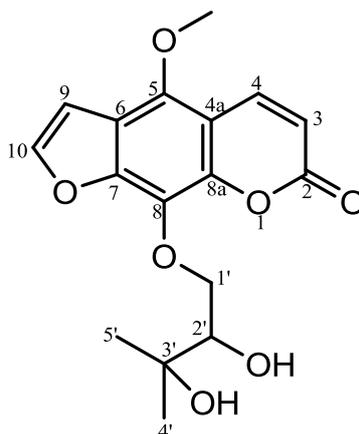
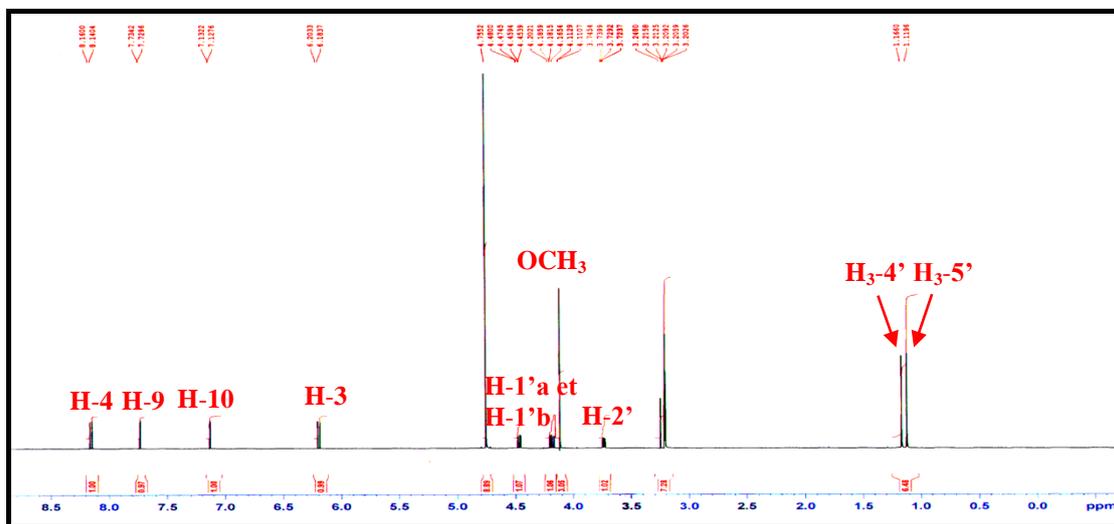
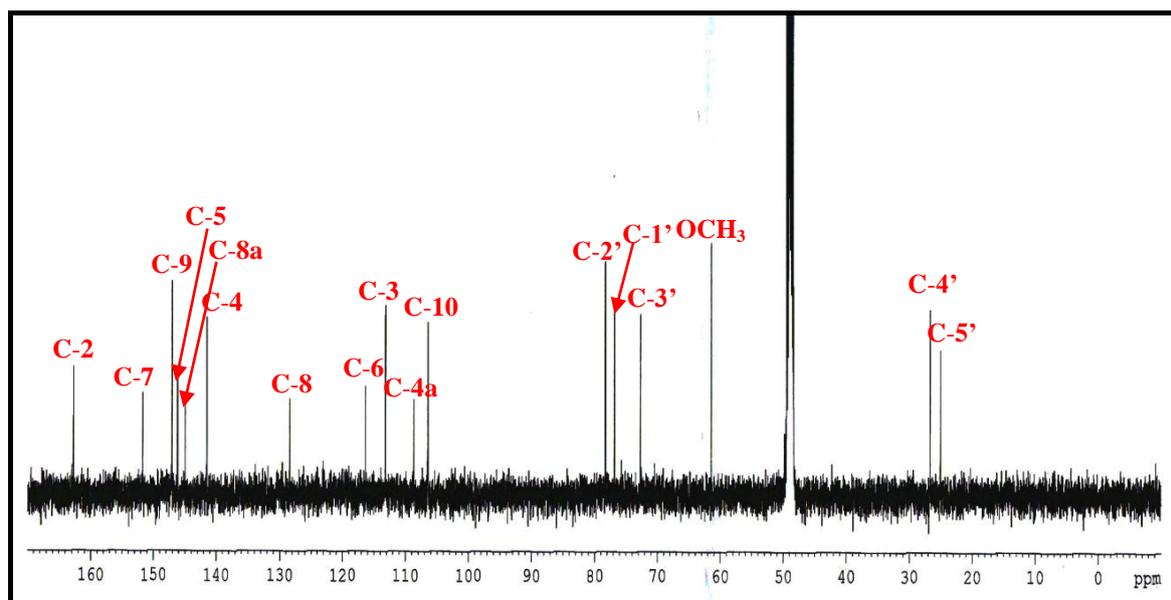


Figure IV.4 : Structure plane du composé CF22-1, **byakangelicine**

Les données RMN de cette molécule sont reportées sur les RMN proton (Spectre IV.9-3) et carbone treize (Spectre IV.7-2) et l'ensemble dans le tableau IV.3.



Spectre IV.9-3 : Spectre RMN  $^1H$  (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1 avec toutes les indications



**Spectre IV.7-2** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé CF22-1 avec toutes les indications

**Tableau IV.3** : Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé CF22-1 (MeOH)

position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Integration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$	
2	162,69	-	-	-	-	
3	113,15	6,19	1H	<i>d</i>	9,8	
4	141,49	8,15	1H	<i>d</i>	9,8	
4a	108,66	-	-	-	-	
5	146,14	-	-	-	-	
6	116,30	-	-	-	-	
7	151,72	-	-	-	-	
8	128,42	-	-	-	-	
8a	144,49	-	-	-	-	
9	147,01	7,73	1H	<i>d</i>	2,2	
10	106,43	7,13	1H	<i>d</i>	2,2	
1'	1'a	76,86	4,47	1H	<i>dd</i>	10,3 ; 2,8
	1'b		4,19	1H	<i>dd</i>	10,3 ; 8,1
2'	78,33	3,73	1H	<i>dd</i>	8,1 ; 2,8	
3'	72,74	-	-	-	-	
4'	26,70	1,17	3H	<i>s</i>	-	
5'	25,05	1,12	3H	<i>s</i>	-	
OCH <sub>3</sub>	61,46	4,11	3H	<i>s</i>	-	

### IV.3- Résultats des activités biologiques

#### IV.3.1- Activité antioxydante dès l'extrait

Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2' diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de Radical Libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine.

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à do L'activité antioxydante de différents extraits de la plante vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical.

Les  $IC_{50}$  des différents extraits et standards, c'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé.

##### IV.3.1.1- Effet scavenger du radical DPPH

Le pouvoir antioxydant des différents extraits est évalué par piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus sont présentés dans, la (Figure IV.5) et la (Figure IV.6).

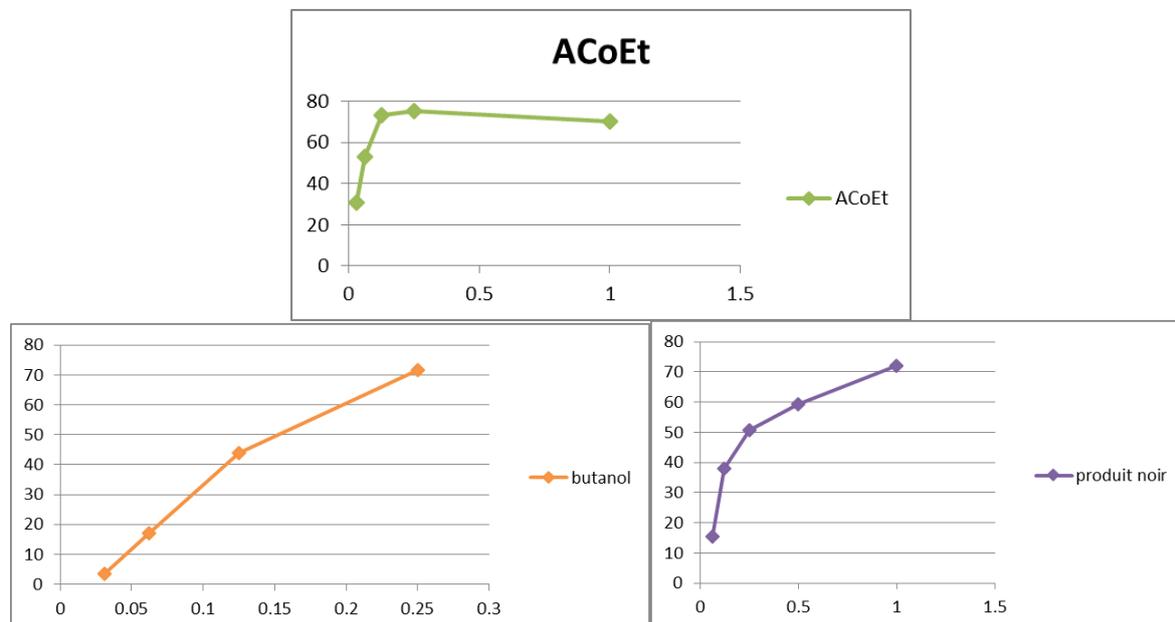
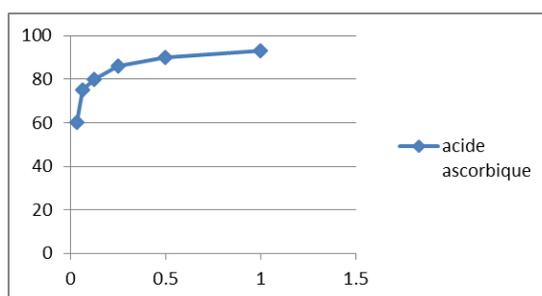


Figure IV.5 : les Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits



**Figure IV.6 :** Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH de l'acide ascorbique en fonction de la concentration

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en valeurs  $IC_{50}$  (une valeur faible d' $IC_{50}$  indique une forte capacité de l'extrait, tandis qu'une valeur élevée indique une faible activité de l'extrait).

Nous avons calculé les  $IC_{50}$  pour les deux extraits et le produit noir F12-2 à partir de l'équation exponentielle de la courbe tracée. Les valeurs des  $IC_{50}$  sont représentées dans le (tableau IV.4).

**Tableau IV.4 :** les valeurs d' $IC_{50}$  pour l'activité antioxydante

Extraits	Acide ascorbique	AcOEt	<i>n</i> -Butanol	Produit noir F12-2
$IC_{50}$ (mg/mL)	0.0197	0.067	0.665	0.161

Tous les extraits ont montré une activité anti-radicalaire en inhibant le radical DPPH dépendant de la concentration.

L'activité de piégeage des radicaux libres du L'extrait AcOEt était supérieure par rapport à l'extrait *n*-butanol.

L'extrait AcOEt a montré un pouvoir antioxydant puissant ( $IC_{50} = 0.067$  mg/mL) comparativement à l'acide ascorbique.

Le produit noir F12-2 a présenté une activité inhibitrice modérée ( $IC_{50} = 0.161$  mg/ml) a l'acide ascorbique.

L'extrait *n*-butanol donne  $IC_{50}$  la plus élevée, donc montré un pouvoir antioxydant la plus bas.

Concernant nos extraits, nous pouvons les classer selon l'ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : l'extrait AcOEt > produit noir F12-2 > l'extrait *n*-butanol.

En général les extraits AcOEt, butanol, et produit noir F12-2 de la plante ont provoqué une décoloration plus au moins différente de la solution DPPH, ceci prouve leur capacités antioxydantes qui est exprimée par les valeurs IC<sub>50</sub>.

#### IV.3.1.2- résultat de dosage des polyphénols TPC

Cette méthode de dosage est basée sur la réactivité entre les extraits phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette réactivité doit être comparée et normalisée avec un produit connu, celui-ci devant être le plus proche possible de la structure du squelette principal des produits phénoliques des extraits. Dans le cas de notre étude, la droite d'étalonnage a été effectuée sur un squelette type Acide gallique (AG). Le dosage quantitatif des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu nécessite tout d'abord l'établissement d'une droite d'étalonnage de standard (AG) Le tracé consiste à la réalisation de six points expérimentaux, chaque point représentant la moyenne de trois analyses.

La quantité des polyphénols correspondante a été exprimée par une courbe d'étalonnage linéaire (Figure IV.7) qui a été rapportée en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé (acide gallique) par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg}$ ) et déterminé par l'équation de type :

$$Y = 0.0142 x - 0.0556 \text{ avec } R^2=0,986$$

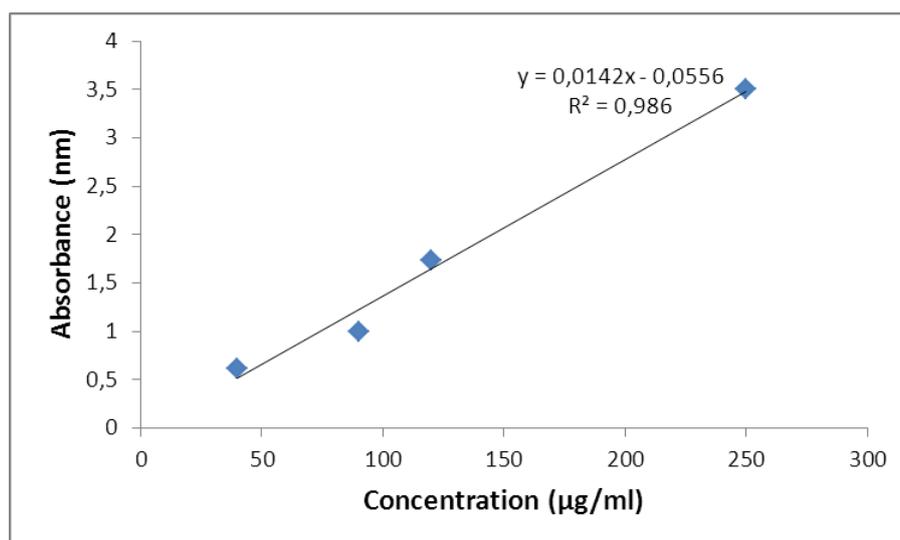


Figure IV.7 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats d'absorbance des extraits sont représentés dans le tableau suivant (Tableau IV.5).

**Tableau IV.5 :** les valeurs d'absorbance des extraits

Extrait abs	Extrait CHCl <sub>3</sub>	Extrait AcOEt	Extraie <i>n</i> -butanol	Produit noir (F12-2)	Produit jaune (F22-1)
Essai 1	0.111	0.253	0.372	0.552	0.120
Essai 2	0.132	0.249	0.385	0.600	0.125
Abs moyen	0.121	0.251	0.378	0.576	0.122

Les résultats concernant les quantités des polyphénols présents dans les extraits sont reportés dans le tableau suivant (Tableau IV.6).

**Tableau IV.6 :** Teneur en polyphénols totaux des parties aériennes

Les extraits	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	<i>n</i> -Butanol	Produit noir (F12-2)	Produit jaune (F22-1)
Taux de phénols (mg GAE/g)	12,43	21,59	30,53	44,47	12,50

Les résultats obtenus montrent que les extraits AcOEt et *n*-butanol et le produit noir (F12-2) séparé de l'extrait chloroformique sont plus riches en polyphénols. Par contre l'extrait CHCl<sub>3</sub> et le produit jaune (F22-1) séparé de la phase CHCl<sub>3</sub> présentent une faible quantité en polyphénols totaux.

Ce résultat, est en accord avec beaucoup d'autres études, qui montrent que la plus grande proportion des composés phénoliques se trouve dans les extraits polaires.

## Conclusion

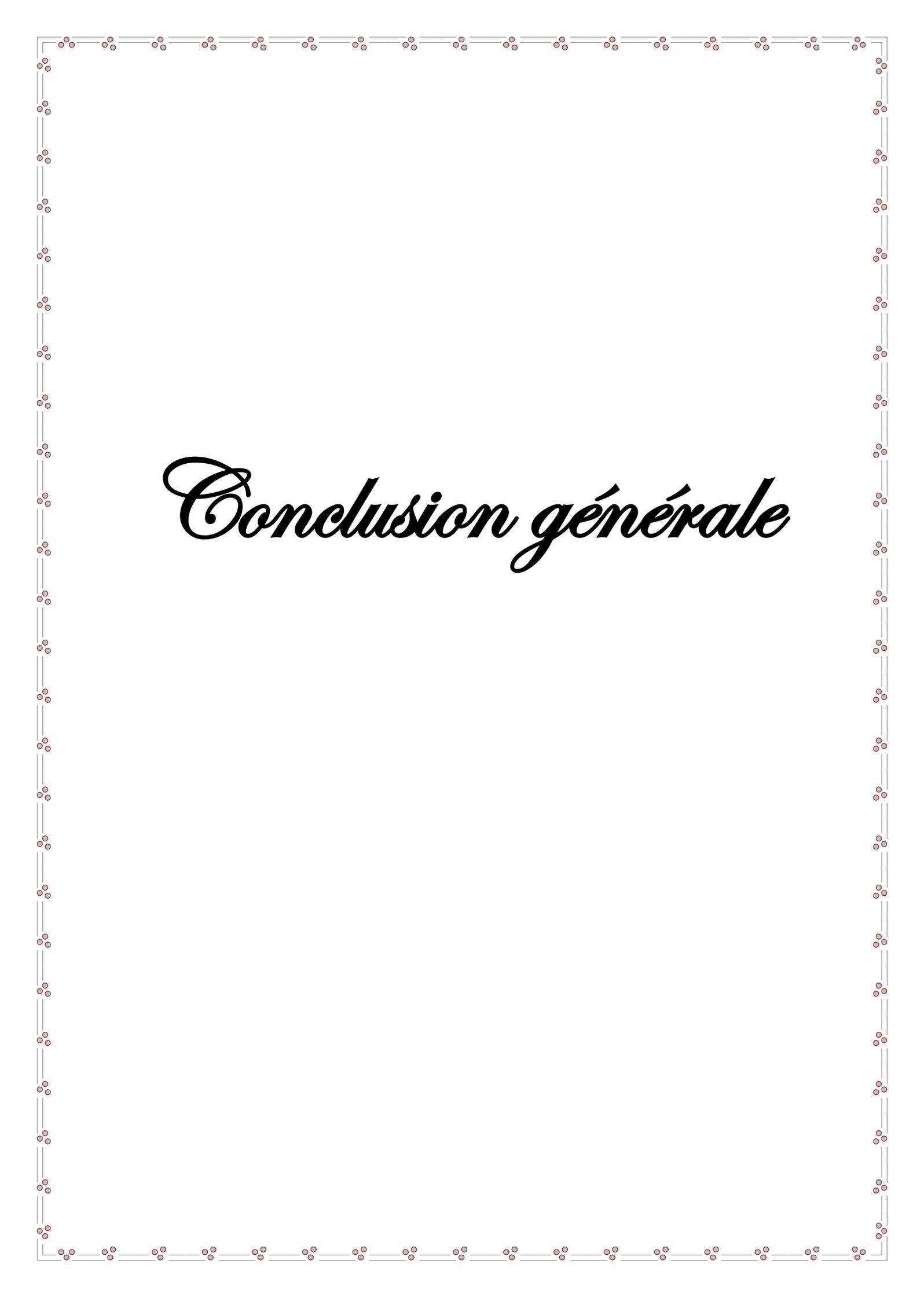
L'étude phytochimique réalisée sur deux fractions de l'extrait chloroforme des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a conduit à l'isolement et la purification de trois produits à l'état pur et natif dont 2 identifiés de type furanocoumarine, il s'agit de : Le xanthotoxol (CF12-2) et la byakangélicine (CF22-1).

Sur la base des résultats obtenus dans la présente étude, nous concluons que les extraits AcOEt et *n*-butanol et le produit noir (F12-2) séparé de l'extrait chloroformique de *P. battandieri* possède des propriétés antioxydantes dans le modèle d'oxydation (DPPH•), le

dommage anti oxydatif prouvé par *P. battandieri* apparaît comme conséquence d'interactions synergiques entre un certain nombre de constituants actifs.

**Références bibliographiques**

- [1] He W, Zhang BL, Zhou SY, Sun XL, Zhang SY. Facial total synthesis of xanthotoxol. *Synth Commun.* 2007 ; 37(3) : 361-367.
- [2] Liu DP, Luo Q, Wang GH, Xu Y, Zhang XK, Chen QC. Furocoumarin derivatives from radix *Angelicae dahuricae* and their effects on RXRa transcriptional regulation. *Molecules* 2011 ; 16 : 6339-6348.
- [3] Wang LH, Mei YH, Wang F, Liu XS, Chen Y. A novel and efficient method combining SFE and liquid–liquid extraction for separation of coumarins from *Angelica dahuricae*. *Separation and Purification Technology.* 2011 ; 77 : 397-401.
- [4] Zheng X, Zhang X, Sheng X, Yuan Z, Yang W, Wang Q. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix *Angelicae dahuricae* by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* 2010 ; 51 : 599-605.



# *Conclusion générale*

## Conclusion générale

Les ressources naturelles du règne végétal restent la source fiable et capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. À l'aide de la médecine traditionnelle, la recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation comme alternative des molécules de synthèse.

Ce travail nous a été confié dans le cadre du stage de fin de cycle du master 2 « Chimie des produits naturels ». Il a pour but principal l'isolement et la purification de métabolite secondaire contenus dans 2 fractions de la phase chloroforme de l'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos.b* appartenant à la flore Algérienne. Le choix de cette plante est justifié par l'endémisme et sa richesse en métabolites secondaires présentant diverses activités biologiques.

Dans le cadre de ce travail nous avons tout d'abord effectué le screening phytochimique des parties aériennes de cette espèce pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. Cette étude a montré essentiellement la présence de coumarines, triterpènes, tanins catéchiques, flavonoïdes et saponines.

Après des tests par chromatographie analytique sur couche mince pour rechercher le meilleur système de solvant pour réaliser l'élution, nos travaux de séparation et de purification par chromatographie sur colonne et chromatographie analytique sur couche mince, ont permis, l'isolement et la purification à l'état pur et natif de 3 produits. Par une simple comparaison avec les produits qui ont été séparés auparavant par notre promotrice, il s'agit de deux coumarines connus et un notre produit nouveau n'est pas encore identifié :

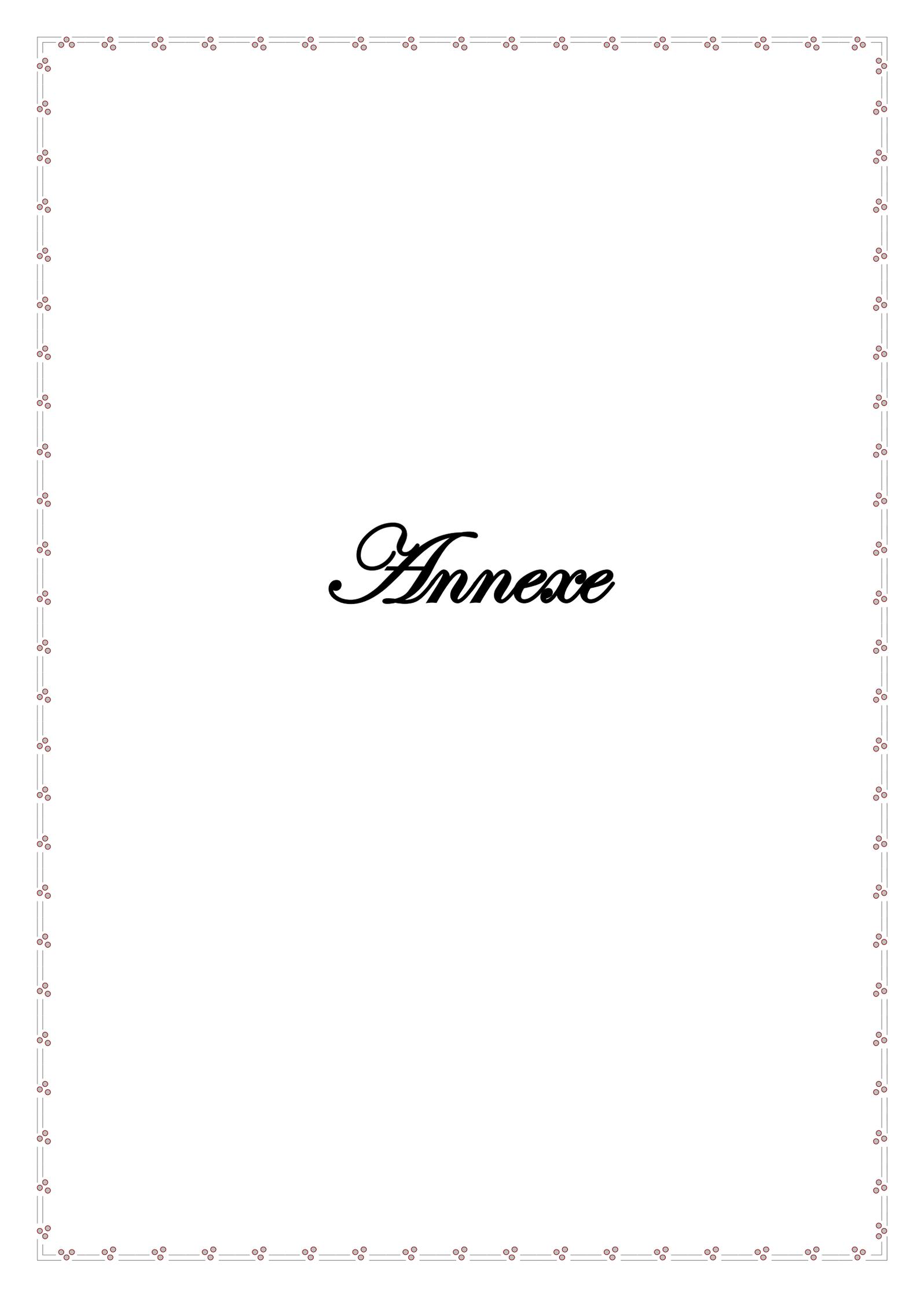
- Le xanthotoxol CF12-2;
- La byakangelicine CF22-1;
- CF12-3 (tache bleu).

Cette étude complète les résultats préalables réalisés par notre promotrice sur cette espèce.

À la fin, nous avons fait l'activité anti oxydantes par la détermination de potentiel anti-radicalaire des extraits AcOEt, *n*-butanol et le produit noir isolé de la fraction CF12 de l'extrait CHCl<sub>3</sub> de parties aériennes de la plante *PB* par la méthode du DPPH. Ainsi que, les taux des polyphénols des extraits *n*-butanol, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, et les deux produits ; le produit noir séparé de la fraction CF12 et le produit jaune séparé de la fraction CF22 par les

méthodes colorimétriques (Folin-Ciocalteu). Cette étude montre le potentiel scavenger de radicaux libres de cette plante et pourrait être considérée comme une source d'antioxydants naturels.

Les résultats obtenus lors de notre étude phytochimique des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire sont donc tout à fait en accord avec les travaux antérieurement publiés sur cette famille et sur ce genre.



# *Annexe*

## Annexe 1

- Le changement de couleur de screening phytochimique



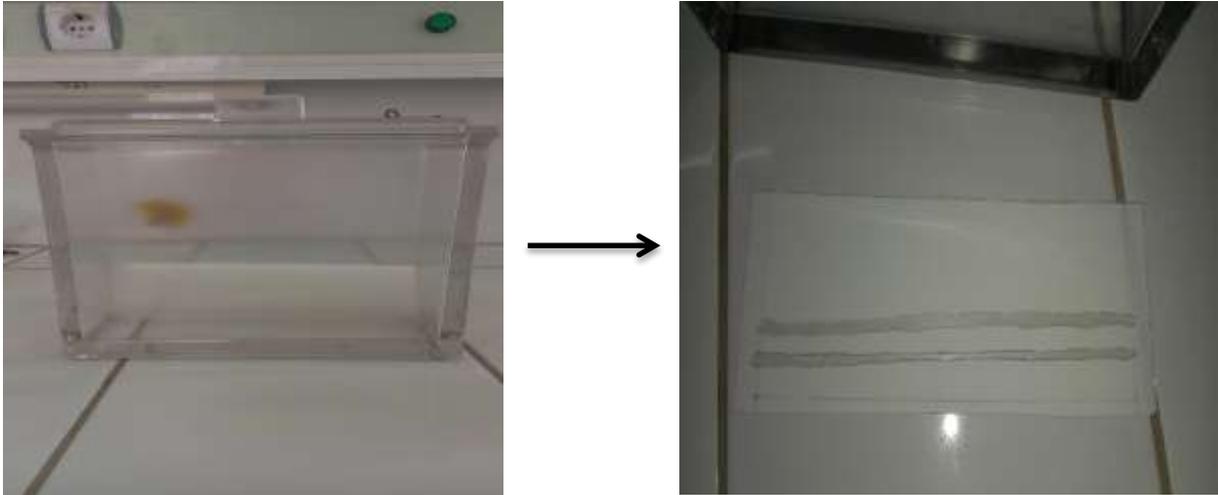
## Annexe 2

- Différents extraits de la plante *pituranthos battandieri* Maire



Annexe 3

- Chromatographie sur couche mince analytique (CCM)



Annexe 4

- Chromatographie sur colonne (CC)



Annexe 5

- **Elimination du solvant par le Rotavapeure**



Annexe 6

- **Spectrophotomètre**

