

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



UNIVERSITE BLIDA 01  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire Présenté Par

**Harti Aicha**

**Mounsi Yamina**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master (LMD)**

**Domaine :** Science de la matière

**Filière :** Chimie

**Option :** Chimie des Produits Naturels

**Titre :**

**Etude phytochimique et l'activité antioxydante de  
l'espèce *Ononis angustissima*  
(*Fabacées*)**

**Devant le jury**

<b>M.R.Zahi</b>	MCB	Président	Université Blida 1
<b>S.Kennouche</b>	MCB	Examinatrice	Université Blida 1
<b>A.Mezrag</b>	MCB	Promoteur	Université Blida 1

**Promotion : 2018/2019**

## *REMERCIEMENTS*

Tout d'abord nous Remercions le bon dieu de nous avoir donné la force, le courage et la volonté, pour avoir terminé ce travail.

Nous remercions sincèrement notre promoteur Monsieur **Mezrag Abderrahmen** pour nous avoir accordé sa confiance et pour nous avoir guidés dans ce travail tout au long de ce semestre. Ses conseils, ses commentaires aussi sa bienveillance et son humour qui nous ont été fort utiles.

Nous remercions sincèrement **MADAME TOUAFK** ; responsable de master des produits naturels pour son aide et ses conseils aussi.

Merci aussi à tous nôtres amis.

Nous tenons à remercier de tout cœur notre famille pour leur soutien sans faille et permanent qui a été essentiel tout au long de nos études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

# *Dédicace*

*Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect, j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.*

*Ma belle sœurs : Imane*

*Mes très chères frères : Okba et Mohamed*

*A mon binôme Aicha*

*Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts*

*Mes amies*

*Amel, Houda, Samia, Zineb, Salima, Sara ,Soumia pour les moments que vous avez vécu ensemble et les souvenirs*

*Mounsi Yamina*





# *Dédicace*

Byhanderi

*À mon dieu, le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.*

*À ma chère mère pour son soutien infatigable, sa patience admirable.*

*À mon cher père pour son affection continuelle, qui m'a beaucoup aidé dans ma vie et durant mes études.*

*À mes frères : Hamza et Walid.*

*A tous mes cousines et cousins :*

*Rokaya, Amel, Chaima, Razika, Romaissa, Seddik, Sohaib, Amin, Ahmed, karim, yousef, Adlen .....*

*À tous mes oncles et tantes pour leur conseils et encouragement.*

*À mes amis proches : Yamina, Meryem, Houda et Amel .*

*À toute ma promotion du master de chimie des produits naturels.*

***Harti Aicha***

## **Résumé**

Ce travail porte sur l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de l'espèce *Ononis angustissima*, appartenant à la famille *Fabaceae (Leguminosae)*, cette espèce est réputée pour sa richesse en métabolites secondaires bioactifs.

L'étude de l'espèce *Ononis Angustissima* a porté sur un screening phytochimique visant à identifier les différentes familles de composés chimiques de cette espèce. Quatre extraits bruts ont été préparés à partir de la partie aérienne de cette plante :

Éther de pétrole (E), Chloroforme (C), Acétate d'éthyle (A), *n*-Butanol (B).

Les résultats des dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes ont montrés que l'extrait **n-BuOH** est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et de la quercétine respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait chloroformique par la méthode du piégeage de radical libre DPPH a montré que l'extrait chloroformique est doté d'une activité antioxydante importante, mais relativement faible que celle d'acide ascorbique .

L'investigation chimique de l'extrait chloroformique des parties aériennes de *Ononis angustissima*, a conduit à l'isolement et la purification de Cinq constituants chimiques dont un produit purs a été identifié grâce à la combinaison des données de RMN <sup>1</sup>H, de la spectroscopie UV-Visible , il s'agit de : 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (6-methoxybaicalein).

L'isolement et la purification des composés ont été effectués par la combinaison de méthodes chromatographiques(CCM, CC) . Leur détermination structurale a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que la spectroscopie UV-visible, la RMN 1D (1H) .

### **Mots clés:**

Phytochimie., *Ononis angustissima*., *Fabaceae*., Polyphénols totaux., Flavonoïde.,  
Activité antioxydante., RMN 1D.

## ***Abstract***

This work relies to the phytochemical study and the antioxidant activity of the species *Ononis angustissima*, belonging to the *Fabaceae (Leguminosae)* family. a species known for its richness in bioactive secondary metabolites.

The *Ononis Angustissima* study focused on a phytochemical screening aimed to identify the different families of chemical compounds in the plant. Four raw extracts were prepared from the aerial part of this plant:

Petroleum ether (E), chloroform (C), ethyl acetate (A), n-butanol (B).

The results of the total polyphenol and flavonoid assays show that the n-BuOH extract is rich in polyphenols and flavonoids than the CHCl<sub>3</sub> extract from the calibration curves of gallic acid and quercetin, respectively.

The evaluation of the antioxidant activity of the chloroform extracts by the DPPH free-radical scavenging method has shown that the chloroform extract has significant antioxidant activity, but relatively low that of ascorbic acid.

The chemical investigation of the chloroformic extract of the aerial parts of *Ononis angustissima*, led to the isolation and purification of Five chemical constituents.

The isolation and purification of the compounds was carried out by the combination of chromatographic methods. Their structural determination was achieved through the use of physicochemical and spectroscopic techniques, such as UV spectroscopy, 1D NMR (1H).

## ***Key words:***

Phytochemistry., *Ononis angustissima*., *Fabaceae*., Total Polyphenols., Flavonoid., Antioxidant Activity., 1D NMR.

## ملخص

يعتمد هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية و نشاط مضادات الاكسدة لنبته تسمى *Ononis angustissima* وهي تنتمي الى عائلة البقوليات (*fabaceae*) الغنية بالايض الثانوي ذو الفعالية البيولوجية.

ان دراسة نوع *Ononis Angustissima* يهدف الى كشف مختلف عائلات المركبات الكيميائية المتواجدة في النبات, تم تحضير اربعة مستخلصات خامة من الجزء الجوي لهذا النبات :

اثير البترول (E), الكلوروفورم (C), خلاص الايثيل (A), ن-بيوتانول (B)

تظهر نتائج فحوصات البوليفينول و الفلافونويد الكلية أن مستخلص n-BuOH أغنى في البوليفينول و الفلافونويدات مقارنة بمستخلص  $CHCl_3$  انطلاقا من منحنيات قياسية لحمض الجاليك و الكرسيتين على التوالي. ان تقدير النشاط المضاد للاكسدة لمستخلص الكلوروفورم بطريقة تفخيخ الجذر الحر DPPH بينت ان مستخلص الكلوروفورم له نشاط مهم للاكسدة , لكنه منخفض نسبيا عن حمض الاسكوربيك .

عملنا يتركز على مستخلص الكلوروفورم للاجزاء الهوائية لنوع *Ononis Angustissima* و قد ادى هذا البحث الى عزل خمسة مكونات كيميائية و قد تم تحديد منتج نقي من خلال مزيج من بيانات  $^1H$  NMR ، التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية ، وهو : 5،7-ثنائي هيدروكسي -6-ميثوكسي فلافون (6-ميثوكسيبيكالين).

ان عزل و تحديد بنية المركبات المستخرجة يعتمد على مختلف الطرق الكروماتوغرافية و كذلك بواسطة استخدام طرق التحليل الطيفي بجميع انواعها كطيفية الأشعة فوق بنفسجية (UV-visible) و مطيافية الرنين المغناطيسي (RMN) .

### الكلمات المفتاحية :

فيتوكيميائية , *fabaceae*, *Ononis Angustissima* , البوليفينول الكلي , الفلافويد , نشاط مضادات الاكسدة , الرنين المغناطيسي النووي.(1D)

## Les abréviations

**APG** :Angiosperm Phylogeny Group

**RL** : radicale libre

**Abs**: Absorbance.

**mg éq Q/g** : mg équivalent quercitine par gramme de matière sèche

**mg éq AG/g** : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

**EtOH** : Ethanol

**HCl** : Acide chlorhydrique

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**KOH** : Hydroxyde de potassium

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>** : Hexane

**MeOH** : Méthanol

**NaOAc** : Acétate de sodium

**Mg** : Magnésium

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Acide borique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique

**OMe** : Méthoxyle

**Me** : Methyl(-CH<sub>3</sub>)

**g** : Gramme

**H** : Hydrogène

**DPPH**: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

**UV** : Ultra violet

**Vis** : Visible

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice de 50% de la population cellulaire

**IP%** : pourcentage d'inhibition

**AAR** : Activité antioxydante relative

**CC** : Chromatographie sur Colonne

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN H<sup>1</sup>** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton



**DEPT**: Sequence Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert

***J*** : Constante de couplage

**$\delta$**  : Déplacement chimique

**s** : Singulet

**d** : Doublet

**m** : Multiplet

**ppm** : Partie par million

## Liste des figures

<b>Figure I.01</b> : photos de l'espèce <i>Ononis angustissima</i> .....	05
<b>Figure I.02</b> : Régions Septentrionales d'Algérie.....	07
<b>Figure I.03</b> : Squelette de base de flavonoïdes.....	08
<b>Figure I.04</b> : Les formes limites et les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique .....	17
<b>Figure I.05</b> : spectres UV-Vis de flavones.....	19
<b>Figure.I.06</b> : spectres UV-Vis de flavonol.....	20
<b>Figure I.07</b> : Formation des différents types de complexes après addition d'AlCl <sub>3</sub> et en présence de HCl .....	20
<b>Figure II.01</b> : L'extraction liquide-liquide des quatre phases.....	25
<b>Figure II.02</b> : protocole d'extraction de <i>l'ononis angustissima</i> .....	26
<b>Figure II.03</b> : Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	29
<b>Figure II.04</b> : Réaction du chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes.....	30
<b>Figure II.05</b> : Protocole de dosage des flavonoïdes.....	30
<b>Figure II.06</b> : Les plaques CCM de l'extrait chloroforme dans le système (Hexane/AcOEt: 8 /2).....	31
<b>Figure II.07</b> : La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme.....	31
<b>Figure II.08</b> : les plaques CCM des fractions 26 jusqu'à 72 (254 à gauche et 365 à droite).....	33

<b>Figure II.09</b> : Résumé des travaux chromatographiques effectués.....	37
<b>Figure II.10</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	40
<b>Figure II.11</b> : Teneur polyphénols des extraits <b>CHCl<sub>3</sub> et n-BuOH</b> .....	41
<b>Figure II.12</b> : La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	41
<b>Figure II.13</b> : Teneur en flavonoïdes des extraits <b>CHCl<sub>3</sub> et n-BuOH</b> .....	42
<b>Figure II.14</b> : La série spectrale UV du composé P1 .....	44
<b>Figure II.15</b> : structure des Flavones.....	44
<b>Figure II.16</b> : Spectre RMN-1H du composé P1 .....	45
<b>Figure II. 17</b> : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (250 MHz ) du composé P1 étalé ( 6,3 à 8,1 ppm).....	45
<b>Figure II.18</b> : 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (6-methoxybaicalein).....	46
<b>Figure III.01</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	47
<b>Figure III.02</b> : Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH de l'extrait chloroforme et l'acide ascorbique (standard) en fonction de la concentration.....	49

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.01</b> : Phylogénie de la famille Fabaceae ( <i>Leguminosae</i> ) (APG II, 2003.....	03
<b>Tableau I.02</b> : Classification systématique de <i>L'ononis angustissima</i> .....	06
<b>Tableau I.03</b> : quelques flavonoïdes isolé de l'espece ononis angustissima .....	09
<b>Tableau I.04</b> : Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV pour les différentes classes de flavonoïdes.....	18
<b>Tableau I.05</b> : les informations structurales qui peuvent être obtenues en utilisant les différents réactifs de déplacement.....	21
<b>Tableau II.01</b> : résultats de la colonne chromatographique .....	32
<b>Tableau II.02</b> : Le fractionnement de la colonne.....	33
<b>Tableau II.03</b> : fractionnement de la colonne du fraction F7.....	35
<b>Tableau II.04</b> : Résultats de l'extraction liquide liquide .....	37
<b>Tableau II.05</b> : Résultats du screening phytochimique .....	38
<b>Tableau II.06</b> : Résultats du dosage des polyphénols.....	40
<b>Tableau II.07</b> : Résultats du dosage des flavonoïdes .....	41
<b>Tableau II.08</b> : Donnée de la série spectrale UV du composé P1.....	43
<b>Tableau II.09</b> : Donnée de spectrométrie RMN <sup>1</sup> H du composé P1.....	46
<b>Tableau III.01</b> : Pourcentage d'inhibition de l'extrait CHCl <sub>3</sub> et acide ascorbique.....	49

## SOMMAIRE

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général.....1

### Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Généralités sur la famille des Fabacées .....3

I.1.2 Présentation de la famille des Fabacées .....3

I.1.3. Caractères botaniques de la famille Fabaceae .....3

I.1.4. Répartition géographique des Fabacées .....4

I.2. Présentation de l'espèce *Ononis angustissima*.....4

I.2.1. Description botanique .....4

I.2.2. Classification systématique .....5

I.2.3. Répartition géographique .....6

I.2.4. Usage traditionnel et propriétés biologiques .....7

I.3. Les flavonoïdes isolés de l'espèce *O .angustissima* .....7

I.3.1. Définition .....8

I.3.2. Structure chimique des flavonoïdes .....8

I.4. Techniques spectroscopiques .....17

I.4.1. Spectroscopie UV-Visible .....17

I.4.2. Résonance magnétique nucléaire (R.M.N) .....21

## Chapitre II : L'étude phytochimique de l'*Ononis Angustissima*

II.1. Matériel végétal .....	24
II.2. Extraction .....	24
II.3. Screening phytochimique .....	27
II.3.1. Préparation des extraits.....	27
II.3.1.1. L'extrait végétal hydro-alcoolique.....	27
II.3.1.2. L'extrait végétal étherique .....	27
II.3.1.3. L'extrait végétal chloroformique .....	27
II.3.1.4. L'extrait végétal de l'acide sulfurique.....	27
II.3.2. Tests de caractérisations.....	27
II.3.2.1. Test de bate-smith (test de flavan3, 4diols) .....	27
II.3.2.2. Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones) .....	27
II.3.2.3. Test des Tannins .....	28
II.3.2.4. Test des Quinones .....	28
II.3.2.5. Test des Anthraquinones .....	28
II.3.2.6. Test des Alcaloïdes .....	28
II.4. Dosage des polyphénols .....	29
II.5. Dosage des flavonoïdes .....	30
II.6. Séparation et purification des composés de l'extrait chloroforme .....	31
II.7. Séparation et purification des fractions .....	34
II.8. Résultats et discussions .....	37
II.8.1. L'extraction .....	37
II.8.2. Les résultats du screening phytochimique .....	38
II.8.3. Dosage des polyphénols totaux .....	39
II.8.4. Dosage des flavonoïdes .....	41
II.8.5. Identification structurale du composé P1 .....	42
II.8.5.1. La spectrophotométrie UV-Visible.....	42

<b>II.8.5.2.Spectrométrie RMN .....</b>	<b>44</b>
---	-----------

### **Chapitre III: L'étude de l'activité antioxydante**

<b>III.1. Activité antioxydante .....</b>	<b>47</b>
<b>III.2. Test au DPPH .....</b>	<b>47</b>
<b>III.2.1. Principe .....</b>	<b>47</b>
<b>III.2.2. Mode opératoire .....</b>	<b>48</b>
<b>III.3. Résultats et discussions .....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>52</b>

## Introduction générale

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux.

L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles à donner des résultats dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [1].

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [2].

Une des originalités majeures de plantes médicinales réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [3].

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes [4].

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes [5].

Parmi ces plantes Médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille *fabacée* .



Le genre *Ononis* appartient à la tribu des trifolieae qui constitue une des 31 tribus relevant de la sous-famille *Papilionoideae*. Ce genre qui compte environ 75 espèces, est largement distribué dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale. [6]

La présente étude a été consacrée à examiner minutieusement la composition phytochimique et à évaluer l'activité antioxydante de parties aériennes de l'espèce *ononis angustissima* qui se trouve au Sahara d'Algérie.

Notre travail sera donc réparti en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de notre travail (généralité sur l'espèce étudiée – la famille, classification, répartition, description, les travaux antérieurs sur l'espèce ....)

Le second chapitre décrit l'étude phytochimique de l'espèce *Ononis Angustissima*, avec une présentation de la méthode d'extraction, screening phytochimique, dosage des polyphénols et flavonoïdes, et les techniques d'analyse chromatographiques, à savoir la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne.

Le troisième chapitre consiste en une étude de l'activité antioxydante de l'extrait chloroformique. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongements du travail.

## I.1. Généralités sur la famille des Fabacées

### I.1.2 Présentation de la famille des Fabacées

La famille des *Fabacées* (*Légumineuses*) est l'une des plus importantes du règne Végétal [7].

Les *Fabaceae* constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [8]. En Algérie, les *Fabacées* ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification [9], et on enregistre 53 genres et 339 espèces [10]. La famille *Fabaceae* réparties entre trois sous-familles : *Papilionoideae* (*Faboideae*), *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae* [11]. La sous famille *Papilionoideae* (*Faboideae*) est la plus importante car elle inclut plus des deux tiers des espèces *légumineuses* [8]. Bien que le terme *Fabaceae* soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique APG (Angiosperm Phylogeny Group), le terme *Leguminosae* est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques.

La position systématique des *Fabaceae* est présentée dans le tableau suivant [12].

**Tableau I.01** : Phylogénie de la famille *Fabaceae* (*Leguminosae*) (APG II, 2003) [12].

Classification	APGII (2003)
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Eudicotyledonae</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Eurosidae I</i>
Sous-ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<b><i>Fabaceae</i> (<i>Leguminosae</i>)</b>
Sous-famille	<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinioideae</i>

### I.1.3. Caractères botaniques de la famille *Fabaceae*

La grande famille des *Fabaceae* (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de *légumineuses* sous laquelle cette famille est plus

connue [8]. La gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines albuminées [13].

Les plantes de la famille des *Fabaceae* possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique [14].

- ❖ Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote [15].
- ❖ Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées.
- ❖ Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les *Fabaceae* les plus primitives (*mimosoidées*) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses.
- ❖ Toutes les *Fabaceae* possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.
- ❖ Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale [14].

## I.1.4. Répartition géographique des *Fabacées*

Le principal centre de la diversité des *Fabacées* est situé en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de la diversité sont localisés également en Afrique et en Asie. En général, les *Fabacées* sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille. Les *Faboidées* sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre. Les *Cesalpinioideae* occupent surtout les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, de l'Afrique et de l'Asie. Les *Mimosoideae* dominent les régions tropicales et subtropicales, colonisent aussi les zones arides et semiarides de l'Afrique, de l'Amérique et de l'Australie [16].

## I.2. Présentation de l'espèce *Ononis angustissima*

### I.2.1. Description botanique

*Ononis angustissima* est une plante rameuse à nombreuses tiges dressées bien verte. Elle peut atteindre 30 à 100 cm. Les rameaux sont persistants après la floraison.

- ❖ Les Feuilles à trois folioles étroites quatre à cinq fois plus longues que large, plus ou moins dentées.

- ❖ Les Feuilles sont munies de deux stipules engainantes à leur base, le pétiole des feuilles est court.
- ❖ Les Fleurs jaunes, petites et moyennes (environ 0,3 à 2,5 cm) portées par un long pétiole qui se prolonge au-delà de l'insertion de la fleur. [17]
- ❖ Les gousses peuvent être régulièrement déhiscent, ou manquer de points de suture et irrégulièrement déhiscent.
- ❖ La corolle et le calice sont généralement persistantes après l'anthèse, avec un ou parfois les deux en fonctionnement dispersion des fruits.
- ❖ Les quatre pétales inférieurs (aile et de la quille) sont partiellement soudés et leurs griffes sont adnées au tube staminal ; les pétales supérieurs (bannière) peuvent également être soudés aux pétales inférieurs, et parfois à l'étamine libre. .
- ❖ La nacelle est souvent de texture du papier et sont entièrement situés dans la corolle persistante et souvent fortement modifiés ou calice.
- ❖ Floraison : Mars – Avril – Mai
- ❖ Fructification : Juin – Juillet – Août [8].



**Figure I.01** : Photos de l'espèce *Ononis angustissima* [18].

### I.2.2. Classification systématique

La naturaliste Linné a défini une dénomination scientifique, qui permet de caractériser chaque espèce par deux noms latins, dont le premier correspond au nom de genre, le second au nom d'espèce [19].

La sous-espèce ou la variété peuvent également être précisés, la famille est généralement indiquée.

La précision de cette dénomination est fondamentale, et se complète par une différenciation chimique pouvant intervenir à des niveaux très variés :

- ❖ Au niveau de la famille : certaines familles botaniques font preuve d'une grande homogénéité chimique : ainsi les lamiacées aromatiques renferme presque toutes une huile essentielle ; les gentianacées ou les astéracées présentent généralement des lactones terpéniques amères.
- ❖ Au niveau du genre : la totalité des espèces du genre Digitalise renferme des hétérosides cardiotoniques ; l'ensemble des espèces du genre Cassia contient des hétérosides anthraquinoniques à propriétés laxatives.
- ❖ Au niveau de l'espèce : une composition chimique rigoureusement identique entre deux espèces différentes est exceptionnelle ; c'est néanmoins le cas chez les sénéés [20].

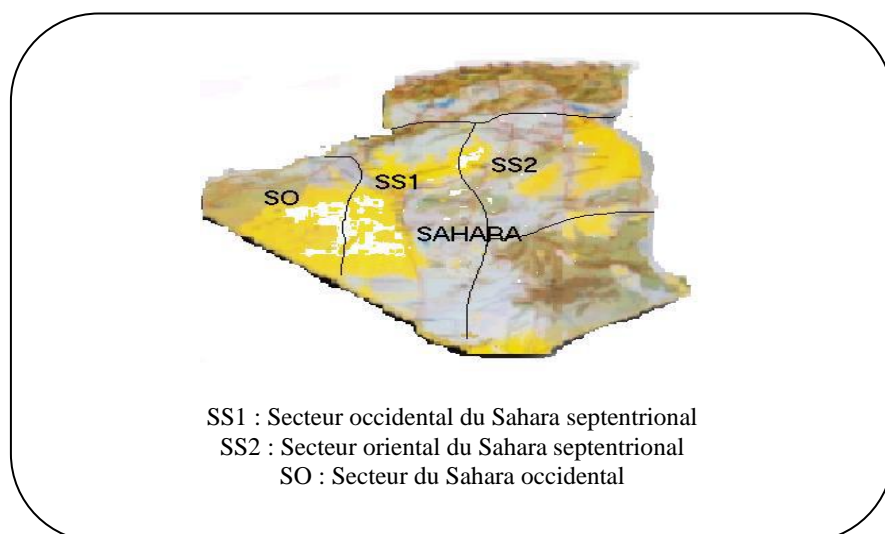
Le tableau suivant résume les informations nécessaires pour la classification de l'*Ononis angustissima*.

**Tableau I.02** : Classification systématique de L'*ononis angustissima*

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<i>Taxonomie</i>	<i>Ononis angustissima</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Spermatophytes</i>
<i>Sous – embranchement</i>	<i>Angiospermes</i>
<i>Classe</i>	<i>Dicotylédones</i>
<i>Sous-classe</i>	<i>Rosidae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Rasale (Fabales)</i>
<i>Famille</i>	<i>Légumineuseae (Fabaceae)</i>
<i>Sous – famille</i>	<i>Papilionaceae</i>
<i>Tribus</i>	<i>Trifoleae</i>
<i>Genre</i>	<i>Ononis</i>
<i>Espèce</i>	<i>Angustissima</i>

### I.2.3. Répartition géographique

Parmi les *légumineuses*, une place particulière peut être accordée à l'espèce *Ononis angustissima* présente dans les dayas et les régions d'Ouargla, Ghardaïa, Biskra et Bechar (Nord du Sahara Algérienne) [21-22].



**Figure I.02 :** Régions Septentrionales d'Algérie

#### **I.2.4. Usage traditionnel et propriétés biologiques**

En médecine traditionnelle, plusieurs plantes de ce genre ont été utilisées dans le traitement de la jaunisse, des inflammations des voies urinaires et des calculs rénaux [23]. Par ailleurs, les espèces d'*Ononis* L. ont été utilisées pour la cicatrisation de plaies, d'eczéma et de rhumatismes, ainsi que contre le cancer et les lésions cutanées, et ont été utilisées en tant qu'agent antiseptique et antimicrobien [24].

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique :

- ❖ *Ononis spinosa* : cette plante est connue depuis longtemps pour son action diurétique. La racine est efficace contre la goutte et diverses affections de l'appareil urinaire et prévient la formation de calculs rénaux et biliaires [25].
- ❖ *Ononis natrix* : les racines et les fleurs sous forme d'infusion, sont utilisées pour le traitement de certains troubles de l'appareil urinaire [26].
- ❖ *Ononis hirta* : les parties aériennes de la plante sont employées pour traiter les boutons de fièvre, l'herpès et le cancer de la peau [6].

#### **I.3. Les flavonoïdes isolés du l'espèce *Ononis angustissima***

Les investigations chimiques réalisées sur l'espèce *O.angustissima* ont mis en évidence la présence des flavonoïdes.

### I.3.1. Définition

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [27].

Les flavonoïdes constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [28].

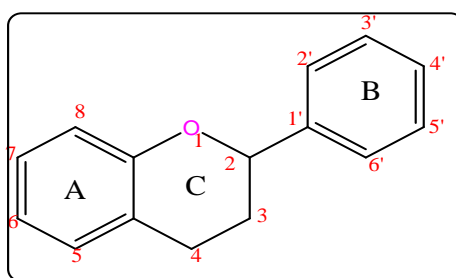
Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes [29].

Ils se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier [30].

### I.3.2. Structure chimique des flavonoïdes

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C<sub>6</sub>, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (**figure I.03**) [31].

La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).

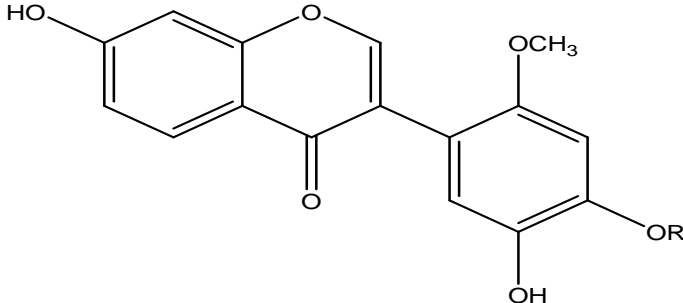
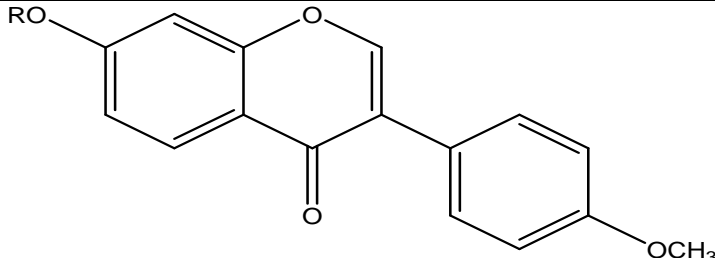
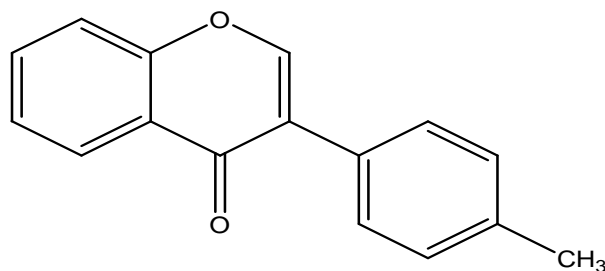
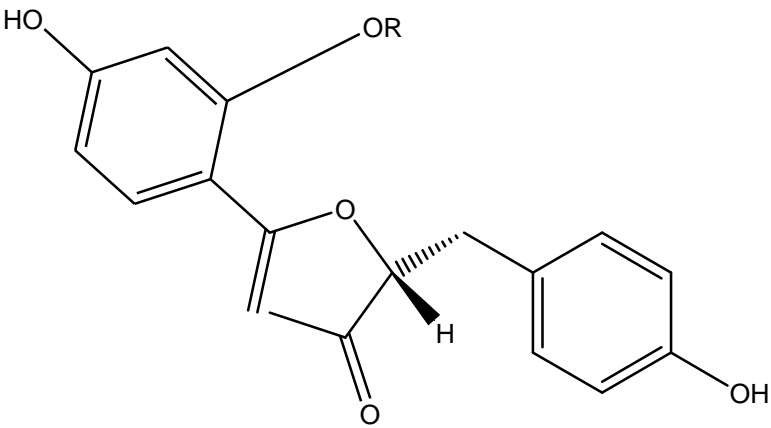


**Figure I.03** :Squelette de base des flavonoïdes

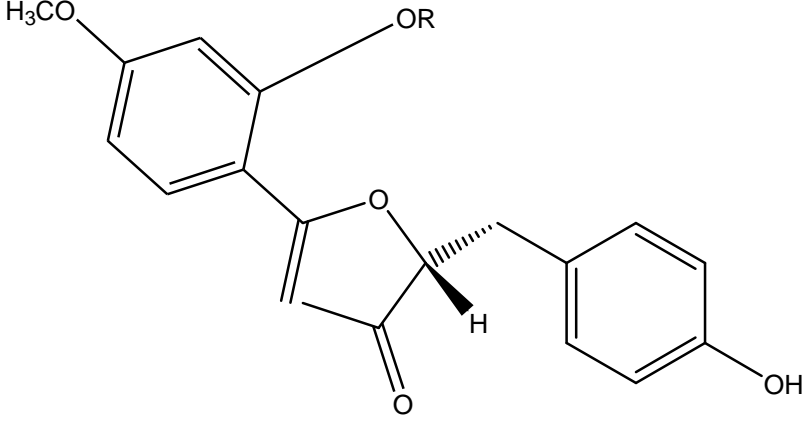
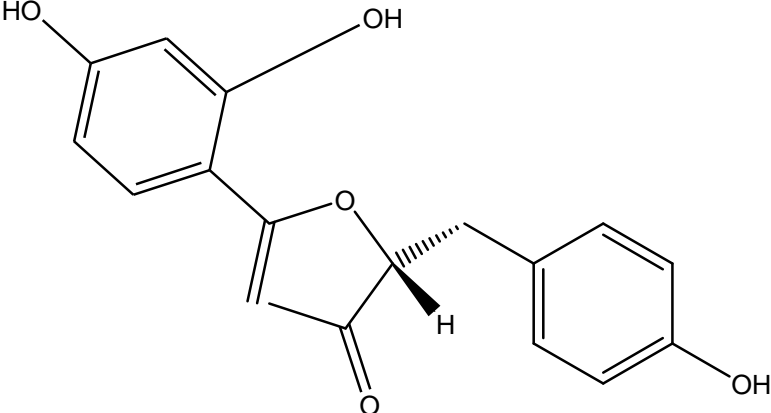
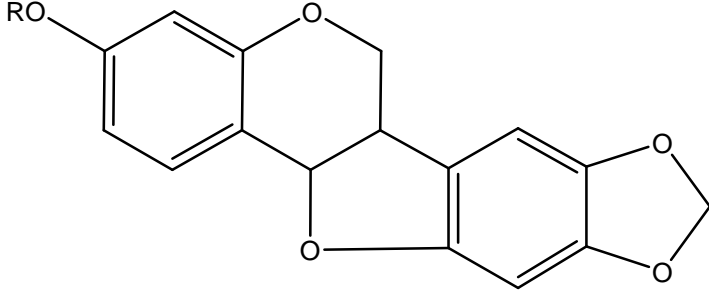
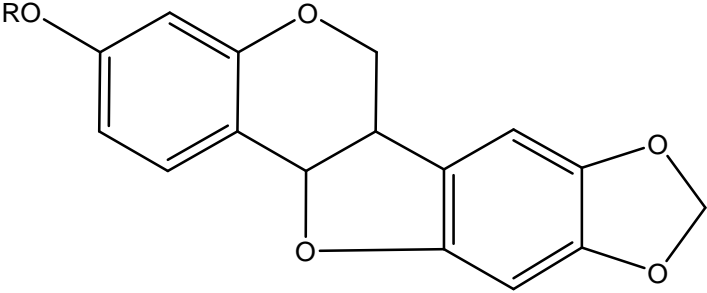
- ❖ Des études antérieures sur la composition chimique de l'espèce *Ononis Angustissima* avaient montré la présence de différents types de flavonoïdes sont isolés de la partie aérienne par diverses techniques chromatographiques (CCM, CC). Leurs structures sont élucidées sur la base d'analyses spectroscopiques RMN, UV-VISIBLE.

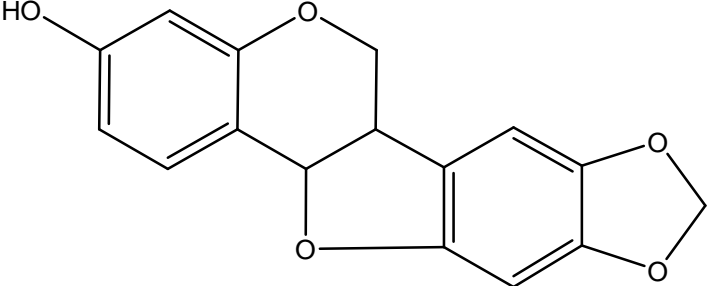
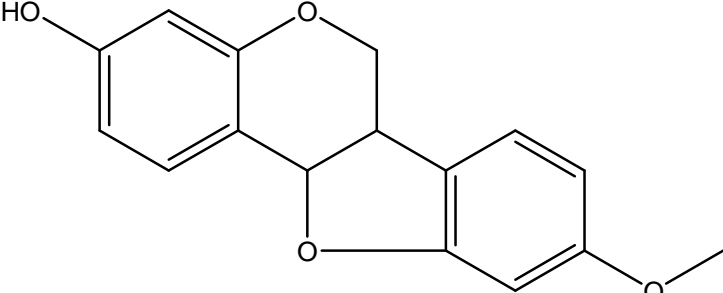
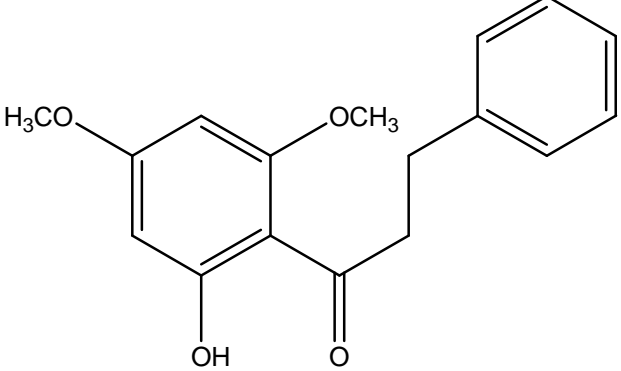
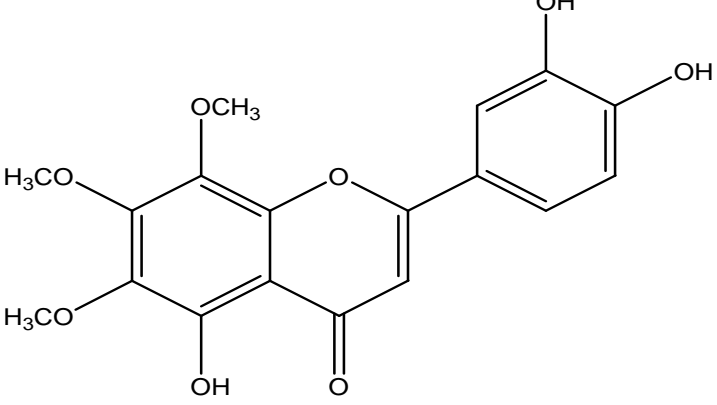
Le tableau suivant résume quelque flavonoïdes isolés de cette espèce .

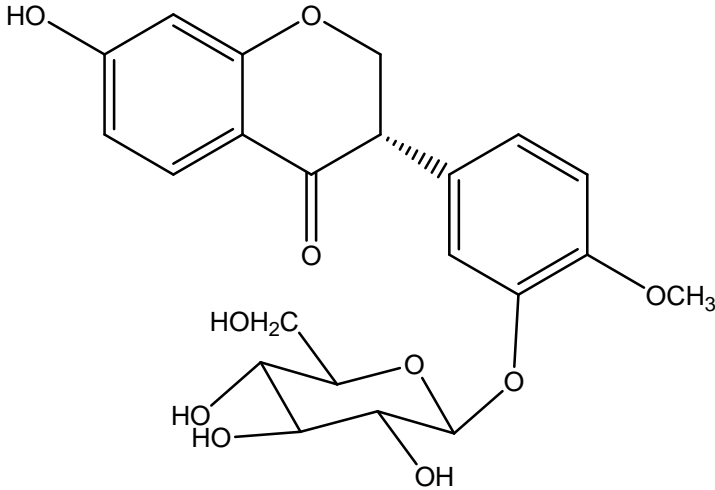
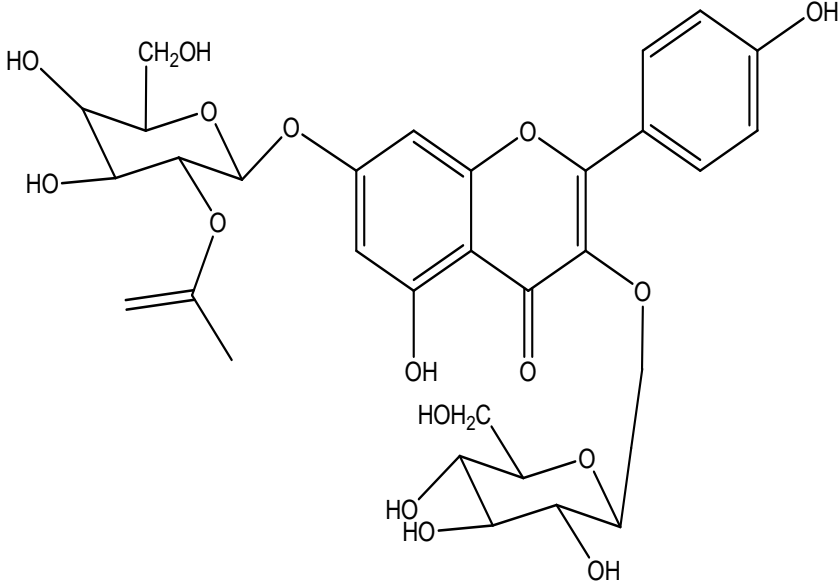
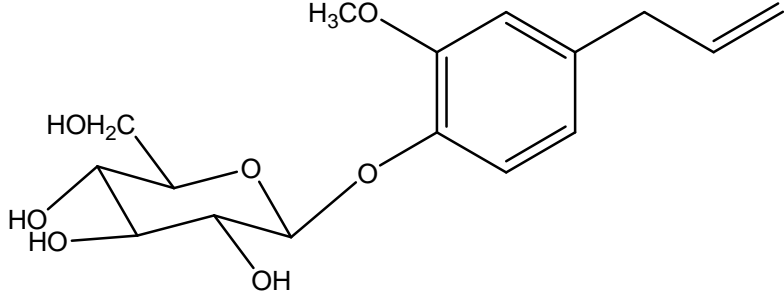
**Tableau I.03 :** Quelques flavonoïdes isolés de l'espèce *Ononis Angustissima*

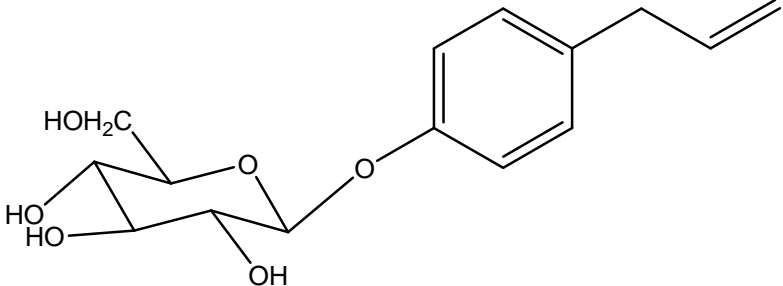
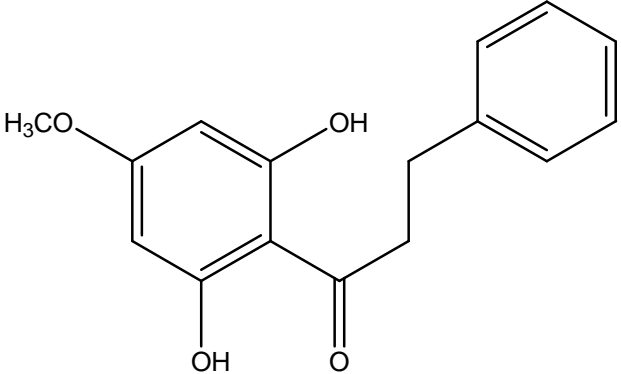
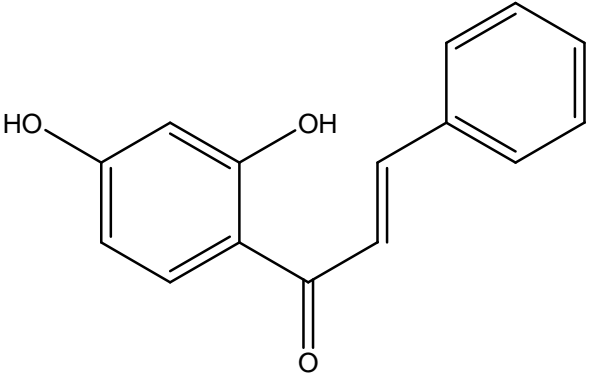
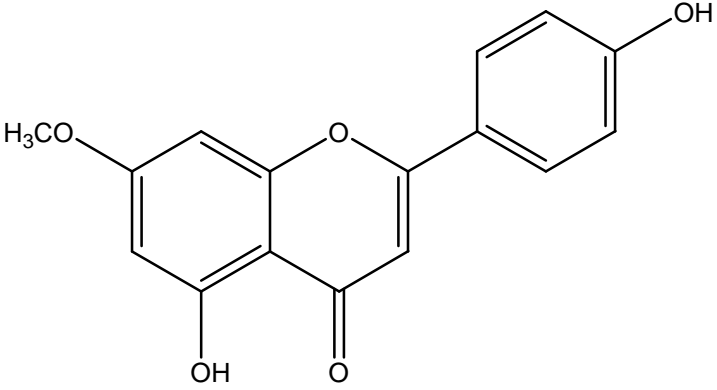
Structure	Référence
 <p>5', 7-dihydroxy-2'-méthoxy-isoflavone 4'-O-β-d-glucopyranoside . R=Glu</p>	[32,33]
 <p>formononétine 7-O-β-d-glucopyranoside. R=Glu</p>	[34]
 <p>formononétine</p>	[35]
 <p>spinonine . R=Glu</p>	[36]

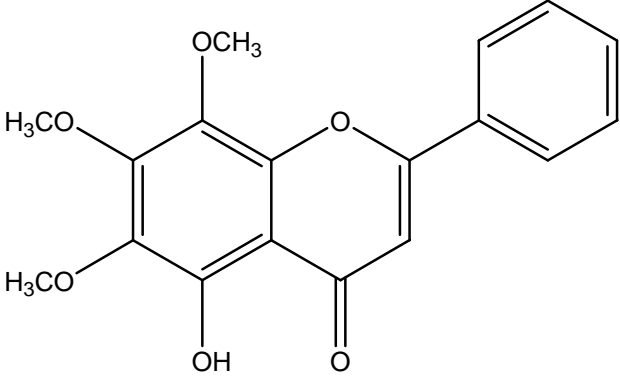
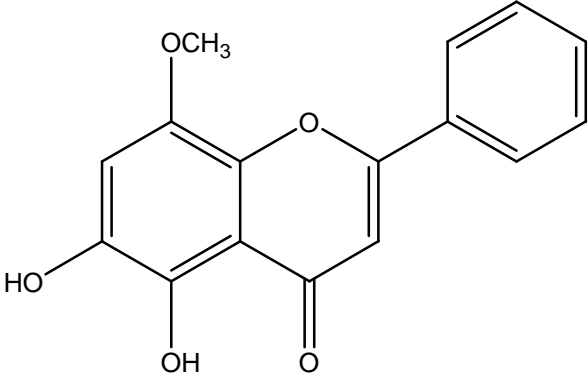
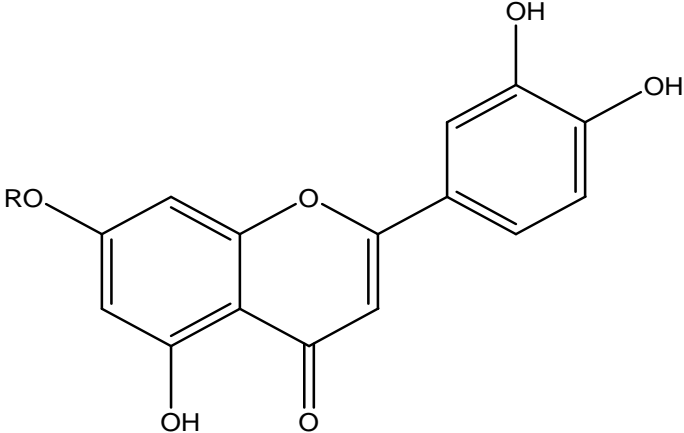
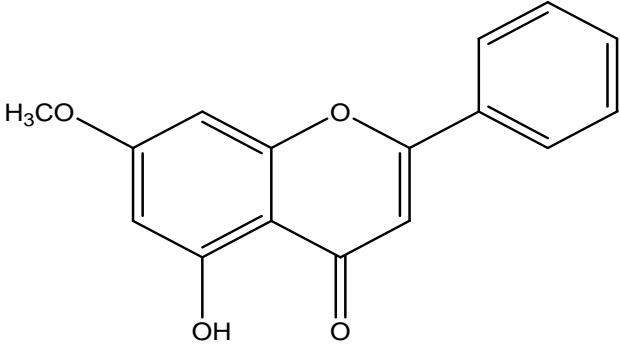


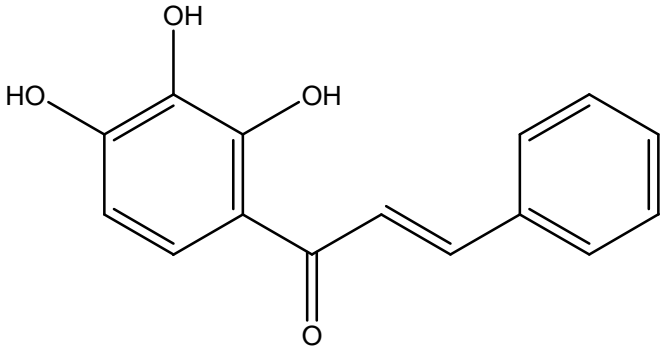
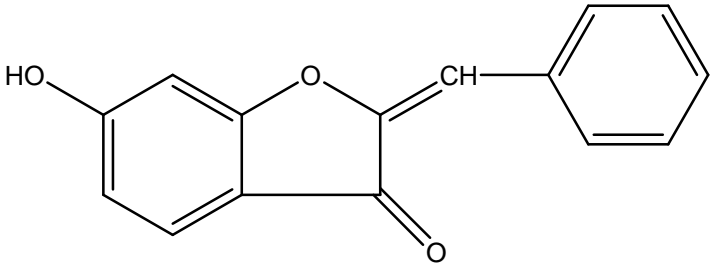
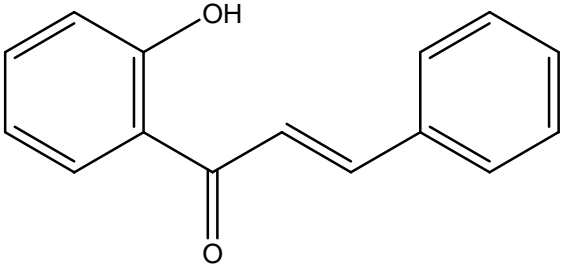
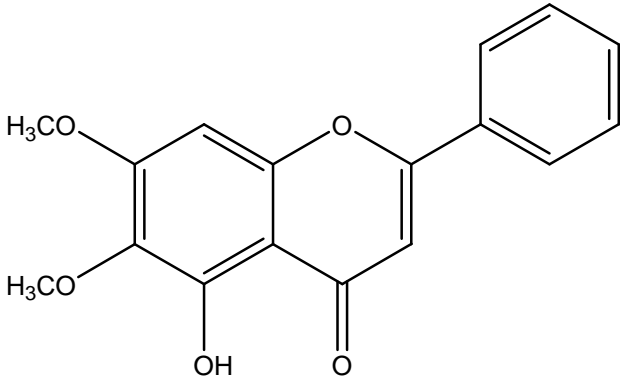
 <p>9-O-méthylspinonine. R=Glu</p>	<p>[36]</p>
 <p>(+) - puérol A</p>	<p>[37]</p>
 <p>trifolirhizine. R=Glu</p>	<p>[38]</p>
 <p>trifolirhizine-6'-O-malonate. R = 6'-O-malonate-Glu</p>	<p>[39]</p>

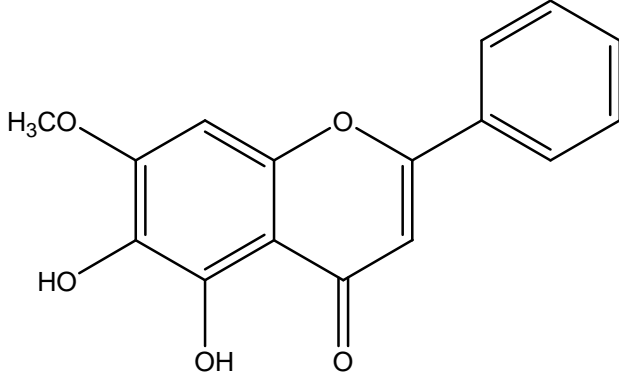
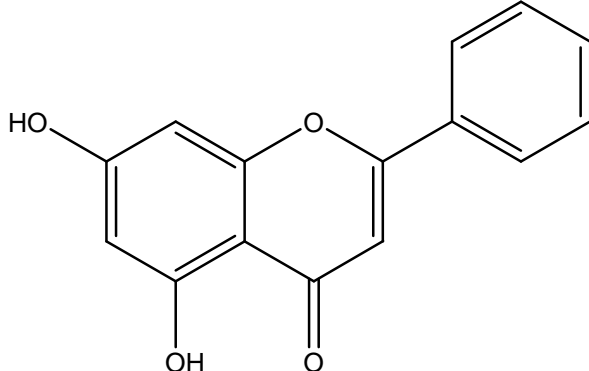
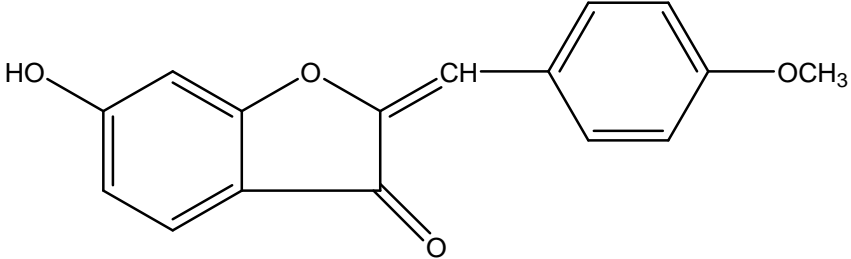
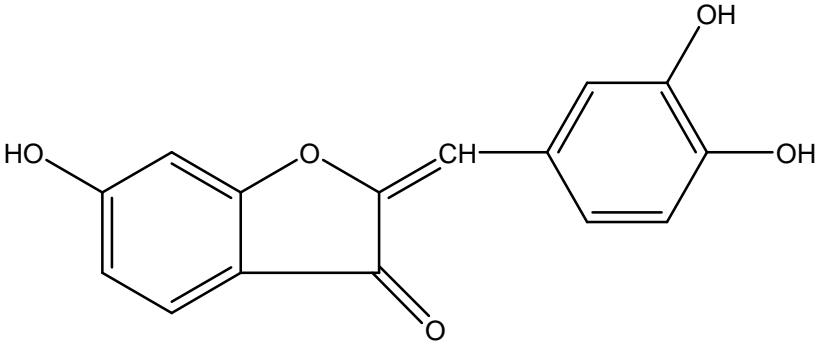
 <p style="text-align: center;">maackiain</p>	[40]
 <p style="text-align: center;">medicarpin</p>	[40]
 <p style="text-align: center;">dihydroflavokawine B</p>	[41]
 <p style="text-align: center;">5,3,4'-trihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone</p>	[42]

 <p>(3S) -7-hydroxy-4-méthoxy-isoflavanone 3'-β-d-glucopyranoside.</p>	<p>[43,44]</p>
 <p>kaempférol 3-O-β-d-glucopyranoside-7-O-(2''-acétyl)-β-d-galactopyranoside.</p>	<p>[45,46,47]</p>
 <p>citrusin C</p>	<p>[48]</p>

 <p>chavicol 1-O-β-d-glucopyranoside</p>	<p>[49]</p>
 <p>2', 6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone</p>	<p>[50]</p>
 <p>2', 4'-dihydroxychalcone</p>	<p>[21,51,52,53]</p>
 <p>7-méthylapigénine</p>	<p>[45]</p>

 <p style="text-align: center;"><i>5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (Alnetin)</i></p>	<p>[54]</p>
 <p style="text-align: center;"><i>5,7-dihydroxy-6,8-diméthoxyflavone</i></p>	<p>[55]</p>
 <p style="text-align: center;"><i>lutéoline 7-O-β-d-glucopyranoside. R=Glu</i></p>	<p>[45]</p>
 <p style="text-align: center;"><i>5-hydroxy, 7-méthoxyflavone (7-O-méthylchrysine)</i></p>	<p>[56,57]</p>

 <p>2', 3', 4'-trihydroxychalcone</p>	<p>[58,59]</p>
 <p>6-hydroxyaurone</p>	<p>[60,61]</p>
 <p>2'-hydroxychalcone</p>	<p>[21,22]</p>
 <p>5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (6, 7-dim' thoxybaicalein)</p>	<p>[21,22]</p>

 <p>5, 6-dihydroxy-7-méthoxyflavone (7-méthoxybaicalein)</p>	<p>[21,22]</p>
 <p>5, 7-dihydroxyflavone</p>	<p>[21,22]</p>
 <p>6-Hydroxy-4'-méthoxy aurone</p>	<p>[21,22]</p>
 <p>6,3',4'-Trihydroxyaurone</p>	<p>[21,22]</p>

## I.4. Techniques spectroscopiques

### I.4.1. Spectroscopie UV-Visible

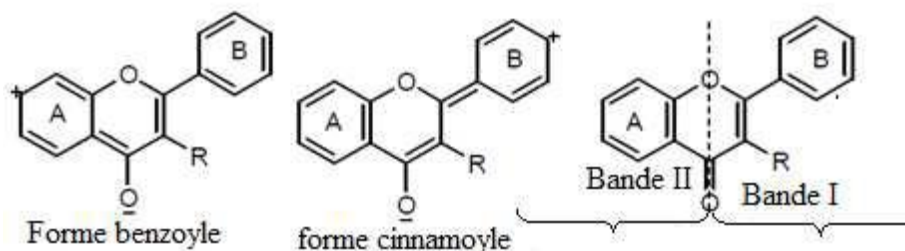
C'est une méthode très importante pour la détermination des composés flavoniques. Son importance réside dans : l'utilisation des faibles quantités de produit, la facilité d'analyse et l'obtention d'informations très importantes sur la position des hydroxyles sur les squelettes flavonique.

#### A. Le spectre UV- Visible dans le méthanol

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que chaque produit à un spectre d'absorption dans le méthanol et l'addition des réactifs provoque un changement dans ce spectre donne des Indications précises sur le squelette flavonique.

On distingue deux types de bandes [62- 63 ] :

- La bande I correspond à l'absorption, dans la gamme de 300-500 nm, du système cinnamoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle C4 avec le noyau B.
- La bande II correspond à l'absorption du système benzoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A. Cette bande est due essentiellement à l'absorption du système chromophore du cycle A dans la gamme de 240-284nm.



**Figure I.04 :** Les formes limites et les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique  
[62,63]

Le déplacement exact et l'intensité des deux bandes I et II du spectre effectué dans le méthanol illustrent la nature de la structure du flavonoïde ainsi que sa substitution, conformément au tableau I.04.



**Tableau .I .04 :** Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV pour les différentes classes de flavonoïdes [62,63].

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250 - 280	310 - 350	Flavone
250 - 280	330 - 360	Flavonol(3-OH substitué)
250 - 280	350 - 385	Flavonol (3-OH libre)
245 - 275	310 – 330 (épaulement)	Isoflavone (5-deoxy-6,7-dioxygéné)
275 - 295	300 - 330 (épaulement)	Flavone et dihydroflavonol
230 - 270 intensité faible	340 - 490 380 - 430	Chalcone Aurone
270 - 280	465 - 560	Anthocyane et anthocyanidine

Parmi les exemples cités, il est clair que, le groupe hydroxyle à la position 7 et le groupe méthoxy à la position 4' n'ont aucune influence sur la bande (II). Seulement un groupe en position 5 peut changer la valeur d'absorption, Quand le groupe methoxy introduit aux positions 3'et 4' du cycle B et le flavone à un groupe hydroxyle à la position 7, la bande (II) est changée vers la gamme 237nm.

Quand le groupe méthoxy est introduit en trois positions du cycle B, la bande (II) peut disparaître ou être affectée par un effet bathochrome.

Pour les flavonols, une augmentation dans le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la Bande I de 3 nm à 10 nm [64].

### B. Addition de réactifs

Outre la caractérisation du spectre d'absorption du produit, généralement dans du MeOH, des informations additionnelles importantes peuvent être obtenues par l'utilisation de réactifs de déplacement. Ceux-ci complexent de manière variable les composés phénoliques en solution et provoquent des déplacements caractéristiques des maxima.

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>+HCl, NaOAc et NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Ces réactifs réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de sels et de complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

- **L'addition de NaOH :** L'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7. Dans le cas des isoflavones hydroxylés sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est

orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [65].

- **L'addition de NaOAc** : Ce réactif sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui de la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des positions 3, 7 et 4' [66]. Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7, ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [65].
- **L'addition de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Le H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence de systèmes ortho dihydroxyle sur le cycle B ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) à cause des complexes formés. L'effet observé est un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol [67].
- **L'addition de AlCl<sub>3</sub>** : L'addition de AlCl<sub>3</sub> à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et la fonction carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et la fonction carbonyle [64] Ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I.
- **L'addition de HCl** : L'addition de HCl dans ce même échantillon provoque la disparition des complexes instables (complexe formé entre deux hydroxyles) et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle). Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence d'AlCl<sub>3</sub> et bien évidemment un effet bathochrome moins important par rapport au spectre dans le méthanol pris comme référence [66].

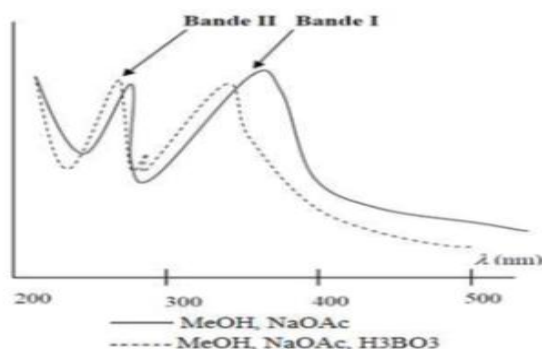


Figure.I.05 : spectres UV-Vis de flavones [62] .

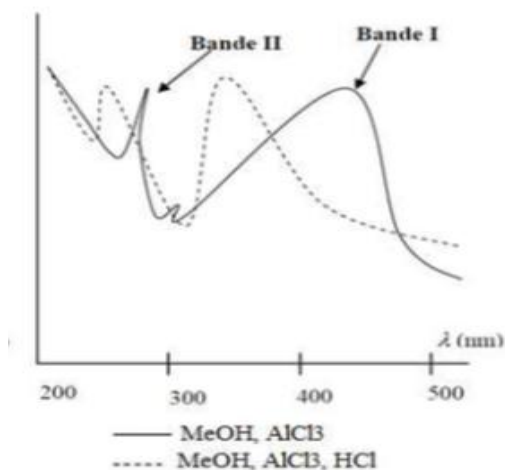


Figure.I.06 : spectres UV-Vis de flavonol [68].

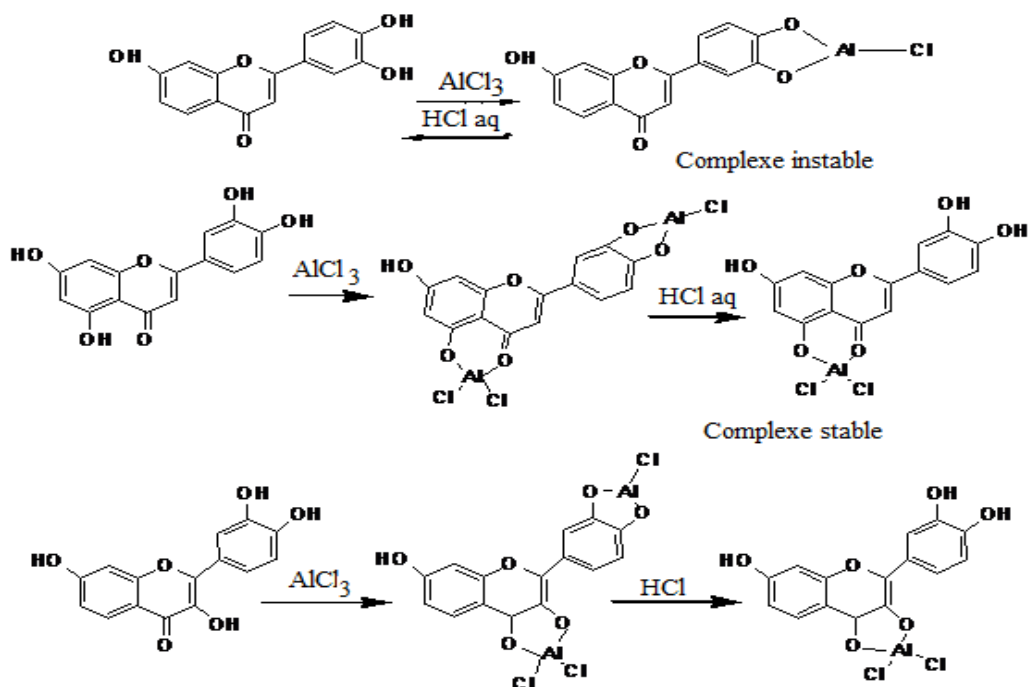


Figure.I.07 : Formation des différents types de complexes après addition d'AlCl<sub>3</sub> et en présence de HCl [62-63].

Le tableau I.05 résume les informations structurales qui peuvent être obtenues en utilisant les différents réactifs de déplacement.

**Tableau I.05.** Les informations structurales provenant des déplacements induits par les réactifs [62,63].

réactifs	déplacement en (nm)		interprétation
	bande I	bande II	
<b>MeOH</b>	310 – 350 352 – 385 350 – 380	250 – 280 250 – 280 250 – 280	Flavones Flavonols (3-OH substitué) Flavonols (3-OH libre)
<b>MeOH + NaOH</b>	+40 à 60 (BI) avec stabilité d'intensité optique +50 à 60 (BI) avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Apparition d'une 3ème bande entre BI et BII Absence de bande entre 320 – 335 Transformation de bande I en une inflexion Décomposition lente		4' - OH 3 OH et 4' OR 4' - OR 7 - OH 7 - OR 5 - OH (Un seul hydroxyle libre) 3,4' di-OH ou ortho di-OH sur le noyau A (6,7 ou 7,8)
<b>AlCl<sub>3</sub>+ MeOH</b>	+20 à 45 (BI) +60 (BI)		5 - OH 3 - OH
<b>AlCl<sub>3</sub>+HCl + MeOH</b>	-20 à -40 (BI) -20 à -25 (BI)		Ortho di-OH sur le noyau B Ortho di- OH sur le noyau A (en plus ortho di-OH sur le noyau B)
	+17 à 20(BI) +35 à 55(BI) +50 à 60(BI)		5 – OH (avec 6-oxygénation) 5 – OH flavone et 3-OMe flavone 3 - OH avec ou sans 5- OH
<b>NaOAc + MeOH</b>	+5 à 20 (BII) Déplacement très faible(BII) Diminution d'intensité avec le temps(BII) le spectre se décompose avec le temps(BII)		7 - OH 7 - OR 6,7 ; 7,8 ou 3',4' di OH 5, 6,7 ; 5,7,8 ou 3,3',4' –tri-OH
<b>NaOAc + MeOH + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	+12 à 36 (BI) +5 à 10 (BI)		3',4' di OH 6,7 ou 7, 8 di-OH

#### I.4.2. Résonance magnétique nucléaire (R.M.N)

La résonance magnétique nucléaire constitue une des techniques d'analyse moderne et les plus efficaces pour la détermination de la structure et de la stéréochimie des molécules organiques complexes [69,70]

Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

**RMN du H<sup>1</sup>** : La réalisation d'un spectre de RMN du proton est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes.

En RMN du proton, trois informations sont importantes [69,70] :

Le déplacement chimique ( $\delta$ ), L'intégration, Le couplage

### **A. Analyse des signaux provenant des protons de la génine**

Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

**Protons du noyau A :** Lorsque le noyau A est disubstitué par des OH en 5 et 7, les protons H-6 et H-8 présentent deux doublets, respectivement, entre 6.16 et 6.25 ppm avec une constante de couplage  $J = 2,5$  Hz et entre 6.39 et 6.56 ppm avec la même constante de couplage. La substitution des OH en positions 5 et/ou 7 conduit au déblindage des deux protons voisins [71].

**Protons du noyau B :** Le déplacement chimique des protons du noyau B se trouve entre 6,7-7,9 ppm. Ce déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C. Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8.5 Hz). Les protons H-2' et H-6' résonnent toujours à des champs inférieurs à ceux des protons H-3' et H-5'. 117

**Protons du cycle C :** Le proton H-3 d'une structure flavone résonne entre 6.20 et -6.40 ppm sous forme d'un singulet [71], pouvant être confondu avec les protons H-6 et H-8.

### **B. Analyse des signaux provenant des protons aliphatiques**

**Protons méthoxyle :** Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.5 et 4.5 ppm.

**Protons du sucre :** protons de la partie osidique : Les déplacements chimiques des protons anomériques dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone.

Les protons correspondants à la partie osidique résonnent à des champs forts par rapport à ceux de la génine (3,5 – 4 ppm). Le proton anomérique (H-1'') résonne à champ faible par rapport aux autres protons à la partie osidique (4,2 à 6 ppm). L'intégration du signal qui est proportionnelle au nombre de protons qu'elle représente permet de déterminer le nombre de sucres, alors que la constante de couplage du proton anomérique permet de déterminer l'anomère  $\alpha$  ou  $\beta$  connaissant la nature du sucre [72].

La constante de couplage entre le proton anomérique du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone s'il s'agit d'une position  $\alpha$  ou  $\beta$ . Le proton anomérique lié à un autre ose, devient relativement loin de l'influence du noyau

flavonique, et résonne à champ plus fort que le proton anomérique lié à la génine. Il donne en général un doublet déblindé par rapport aux autres protons osidiques et sa constante de couplage est de  $J=7\text{Hz}$  car il est toujours en position  $\beta$  d'après la biogénèse [73].

### **II.1. Matériel végétal**

Pour la réalisation des objectifs de notre travail, la plante *ononis angustissima* a été récoltée en Mars 2019 dans la région de (**Biskra**). Nous avons choisi cette plante car d'après la littérature, elle est très reconnue par sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

Le matériel végétal (partie aérienne) est nettoyé (débarrassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'ombre, à l'abri de la poussière et de la lumière dans un endroit bien aéré (on obtient m=250g).

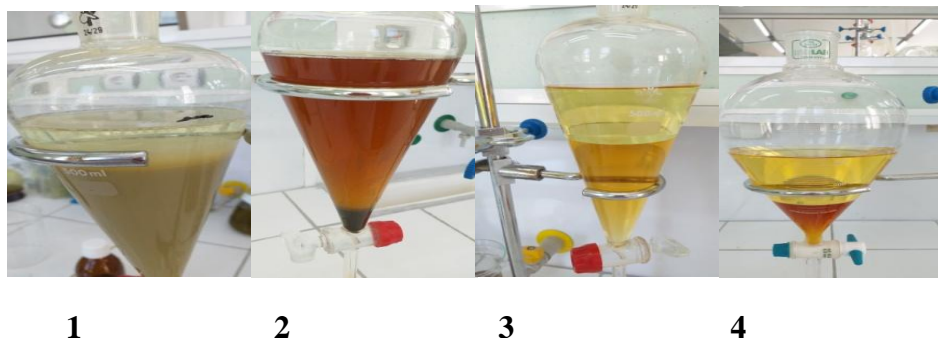
### **II.2. Extraction**

L'extrait hydroalcoolique a été obtenu par trois macérations successives et agitation du matériel végétal dans une solution hydro-alcoolique (éthanol/eau) dans la proposition (80/20 : v/v) pendant 24h à une température ambiante, avec renouvellement du solvant et pendant 48h, 72h successivement afin d'extraire le maximum. Cette opération effectuée à froid, permet d'éviter la dégradation des produits thermolabiles.

Après filtration, Le filtrat obtenus est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 35-40°C.

on ajoute 400 ml d'eau distillée à cet extrait, après en filtrant sur un Buchner, le filtrat subit une extraction 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.

- ❖ **(1) Phase Ether de pétrole** : une seule fois (**200ml**), et après concentration on obtient une masse de (**0,50g**). l'intérêt de l'utilisation de l'éther de pétrole est d'éliminer les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides ; et tous les composés non Phénoliques ainsi que toutes les impuretés.
- ❖ **(2) Phase chloroformique**: (**3×100ml**) et après concentration on obtient une masse de (**7,16g**) : permet de retenir les composés phénoliques simples tels que les acides phénols et les flavones lipophyles.
- ❖ **(3) Phase Acétate d'éthyle**: (**3×100ml**) et après concentration on obtient une masse de (**4,08g**) : entraine les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides.
- ❖ **(4) Phase n-butanolique**: (**3×100ml**) et après concentration on obtient une masse de (**2,38g**):entraine les composés phénoliques polaires, les tri-O-glycosides et partiellement les n-O-glycosides.



**Figure II.01 :** L'extraction liquide-liquide des quatre phases

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant (v/v) sont mélangés énergiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz des produits, après un repos d'une demi-heure on récupère séparément la phase aqueuse et le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques. La phase chargée des molécules spécifiques sont récupérées séparément et les différentes phases récupérées (Ether de pétrole, chloroforme, Acétate d'éthyle, phase *n*-butanolique) sont évaporées à sec, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation pour le diagnostic chromatographique, pour la réalisation des dosages et la détermination des activités biologiques notamment l'activité antioxydante [74].



## Chapitre II L'étude phytochimique de *l'Ononis Angustissima*

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma suivant.

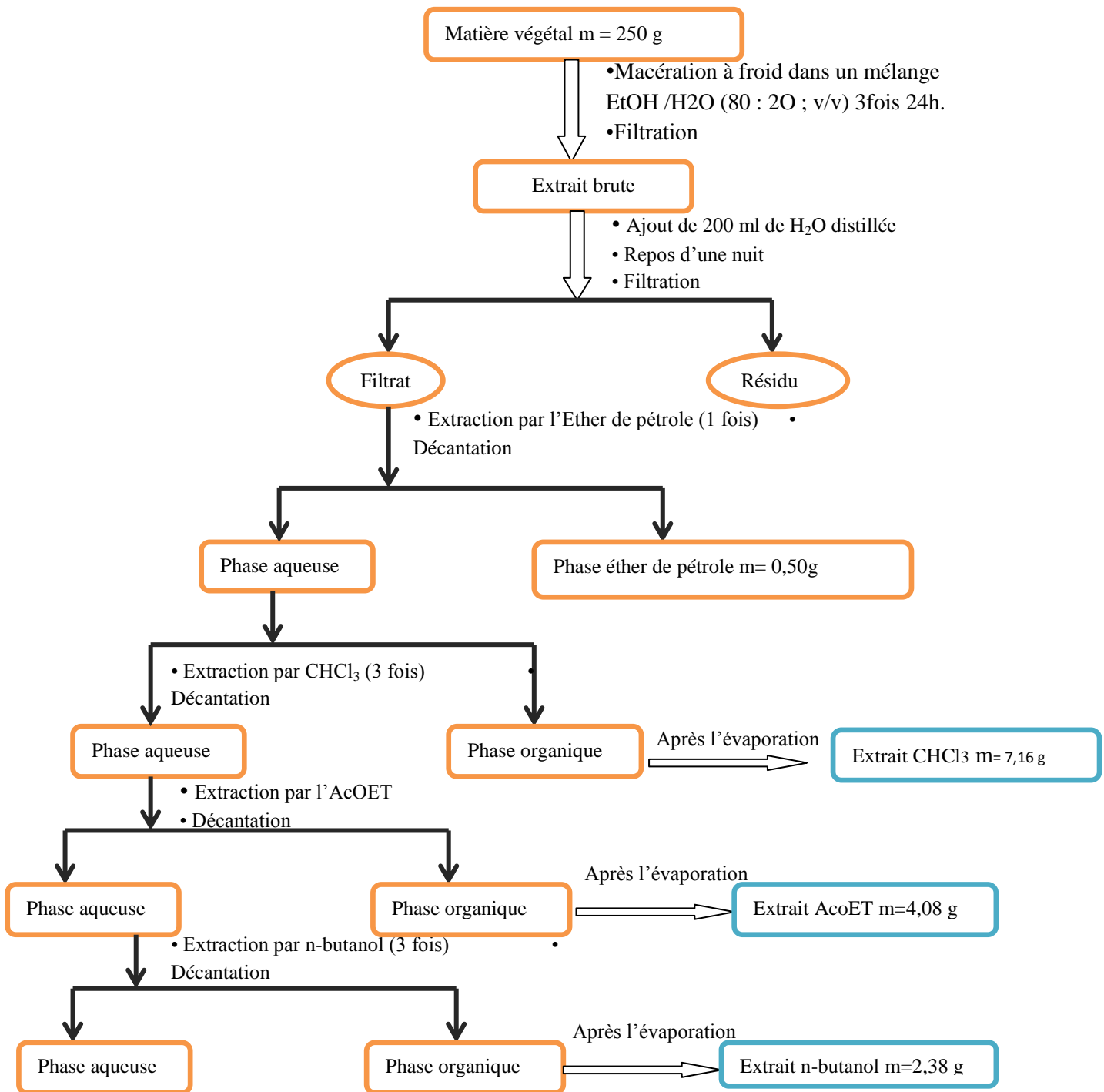


Figure II.02 : protocole d'extraction de *l'Ononis angustissima*

### **II.3. Screening phytochimique**

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupement chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques [75].

#### **II.3.1.Préparation des extraits**

##### **II.3.1.1. L'extrait végétal hydro-alcoolique**

07 g de matériel végétal (partie aérienne) sont mis en contact avec 100 mL de mélange (EtOH / Eau). Après agitation et un repos de 24 h le mélange est filtré et l'extrait est soumis aux différents tests.

##### **II.3.1.2. L'extrait végétal étherique**

On met dans un erlenmeyer **7g** du matériel végétal (Broyée) avec **30 ml d'éther** de pétrole. après **24 h** on filtre et on obtient l'extrait étherique.

##### **II.3.1.3. L'extrait végétal chloroformique**

On met dans un erlenmeyer **4g** du matériel végétal (Broyée) avec **50 ml** chloroforme et éther de pétrole (**40/10**). après **24 h** on filtre et on obtient de l'extrait chloroformique.

##### **II.3.1.4. L'extrait végétal de l'acide sulfurique**

0,2 g de matériel végétal (partie aérienne) sont mis en contact avec 10 mL de l'acide sulfurique dans un erlenmeyer avec une agitation pendant 2 minutes. Le mélange est filtré et l'extrait est soumis au test d'alcaloïdes.

### **II.3.2. Tests de caractérisations**

#### **II.3.2.1.Test de bate-smith (test de flavan3, 4diols)**

On met dans deux tubes **2 ml** de l'extrait hydro-alcoolique (hydro-éthanolique) .on additionne dans l'un des tubes l'HCl concentré (0,5ml) et l'autre reste comme témoin .On Porte au bain marie pendant **30** minutes.

- ❖ L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de Leucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols [76].

#### **II.3.2.2.Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones)**

On met dans deux tubes **2 ml** de l'extrait hydro-alcoolique (hydro-éthanolique). on additionne dans l'un des tubes l'HCl concentré (0,5ml) et l'autre reste comme un témoin .On ajoute tout doucement quelques fragments de magnésium, on laisse agir sous la hotte.

- ❖ L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (Flavonols) ou le rouge violacées (Flavonones et Flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes [76].

### **II.3.2.3. Test des Tannins**

On met dans trois tubes **2 ml** de l'extrait hydro-alcoolique (hydro-éthanolique). On additionne **4 à 5** gouttes de gélatine à **1%** dans le premier tube et on additionne aussi **4 à 5** gouttes de (FeCl<sub>3</sub> en solution méthanolique) dans le deuxième tube et le troisième tube reste comme un témoin .

- ❖ La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques, avec précipitation dans les tests de gélatine [77].

### **II.3.2.4. Test des Quinones**

On met dans les **2** tubes **2 ml** de l'extrait éthérique et on ajoute NaOH **10%** dans l'un des tube .

- ❖ Après agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violette de la phase aqueuse confirme la présence des quinones [78].

### **II.3.2.5. Test des Anthraquinones**

On met dans **2** tubes **2 ml** de l'extrait chloroformique .On ajoute KOH **10%** dans l'un des tubes et l'autre reste comme un témoin

- ❖ Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge [79].

### **II.3.2.6. Test des Alcaloïdes**

#### **Réactif de Mayer composition**

Iodure de potassium (KI) 25 g, chlorure mercurique(HgCl<sub>2</sub>) 6,8 g , L'eau distillée (100 ml).

#### **Réactif de dragendorff composition**

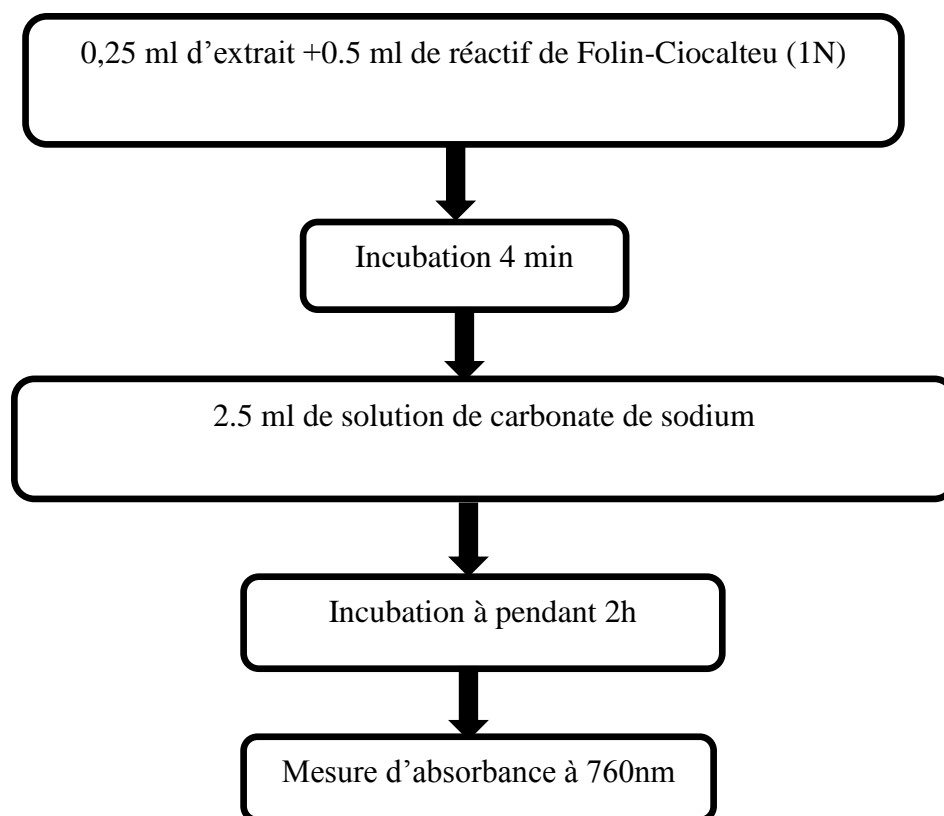
Nitrate de bismuth (1,7 g), Acide tartrique concentré(20 g) ,Eau distillée( 100 ml) ,Iodure de potassium(10 g) ,Eau distillée ( 100 ml).

On met dans 3 tubes **2 ml** de l'extrait végétal de l'acide sulfurique .on met dans le premier tube **5** gouttes de réactif de Mayer et dans le 2<sup>ème</sup> tube on met **5** gouttes de réactif de Dragendorff et le troisième tube reste comme témoin.

- ❖ La présence des alcaloïdes est constatée par des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux :
- ✓ Blanc jaunâtre dans le premier tube.
  - ✓ Orange dans le deuxième tube [80].

### II.4. Dosage des polyphénols

La teneur totale en polyphénols a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les polyphénols mis en présence du Carbonate de Sodium, conduisent à une forme ionisée, l'ion phénolate. Par l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu, l'ion phénolate est oxydé puis simultanément réduit en donnant une solution colorée bleue dont on détermine l'absorbance. 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) ont été mélangés avec 0,25 ml de chaque extrait préparé dans l'eau distillée avec une concentration de (1 mg/ml), après 4 minutes à température ambiante et à l'obscurité, 2,5 ml de Carbonate de Sodium (20%) ont été ajoutés. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons et de la solution étalon ont été mesurés à 760 nm avec un spectrophotomètre. Des concentrations croissantes d'acide gallique (3.90-1000 $\mu$ g/ml) ont été utilisées pour obtenir une courbe standard. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (mgEAG/g PS) [81].

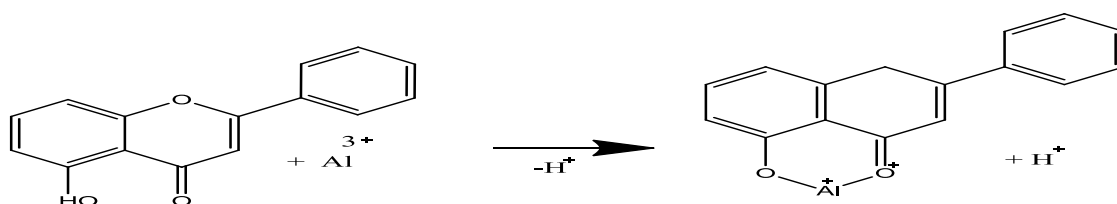


**Figure II.03 :** Protocole de dosage des polyphénols totaux [82].

### II.5. Dosage des flavonoïdes

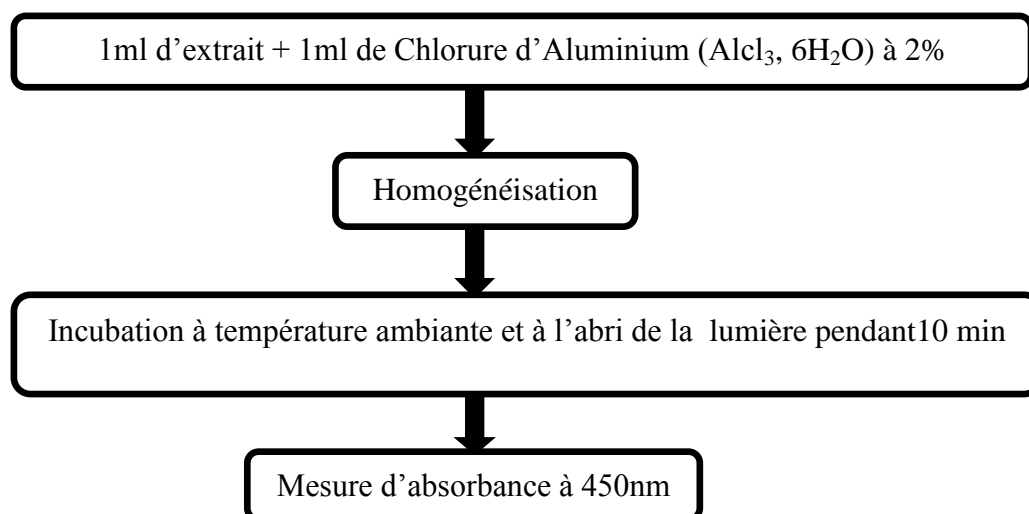
Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes [83].

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme composés de référence [84], cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui a un maximum d'absorption à 420 nm. L'extrait chloroformique et n-butanolique de cette espèce ont été préparés dans des solutions de méthanol avec une concentration de 1 mg/ml. Ensuite, 1 ml de chaque solution a été mélangé avec 1 ml d'une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium (2%) avec une agitation de 2 minutes. L'absorbance a été mesurée après 10 min de temps à 450 nm. Toutes les solutions sont réalisées en triplicata. L'absorbance de la solution méthanol des standards (quercétine) (3.90-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) a été mesurée dans les mêmes conditions et les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine d'extrait (EQ mg/g PS) [83,84].



**Figure II.04 :** Réaction du chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes [78].

Les concentrations en flavonoïdes ont été estimées en référant à une courbe d'étalonnage préparée avec la quercétine. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de quercétine (mg Eq Q/g MS) [87].

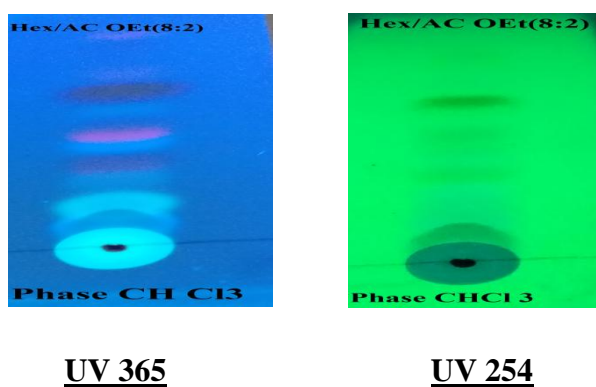


**Figure II.05 :** Protocole de dosage des flavonoïdes

### II.6.Séparation et purification des composés de l'extrait chloroforme

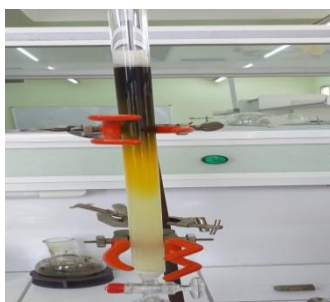
La chromatographie sur couche mince est une méthode analytique utilisée pour la séparation, identification des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire, en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage [88].

L'extrait chloroforme de la plante est soumis à une chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice du meilleur système d'éluion. Les tests effectués ont montré que les meilleurs séparations sont obtenus avec le système (Hexane / Acétate d'éthyle : 8/2) .



**Figure II.06 :** Les plaques CCM de l'extrait chloroforme dans le système (Hexane/AcOEt: 8 /2)

Après avoir trouvé le bon système, la séparation de la phase de chloroforme été effectuée sur une colonne de gel de silice préparée dans l'hexane où environ de 3,5g de l'extrait chloroforme y ont été déposés. L'éluion a été réalisée avec de l'hexane et un gradient d'acétate d'éthyle.



**Figure II.07 :** La séparation chromatographique sur colonne de l'extrait chloroforme

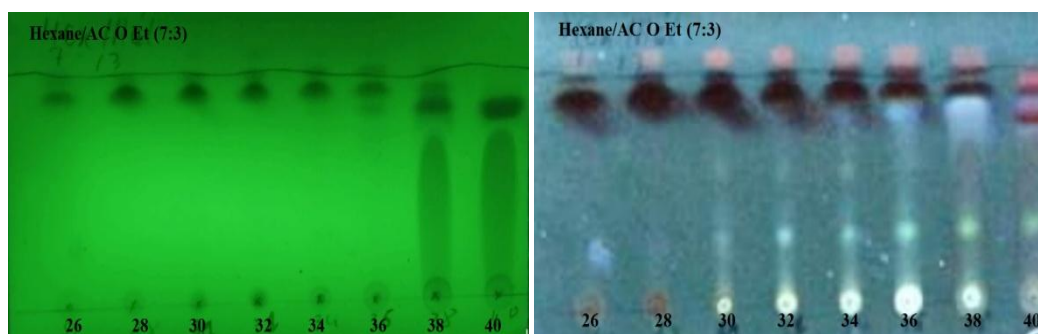
## Chapitre II *L'étude phytochimique de l'Ononis Angustissima*

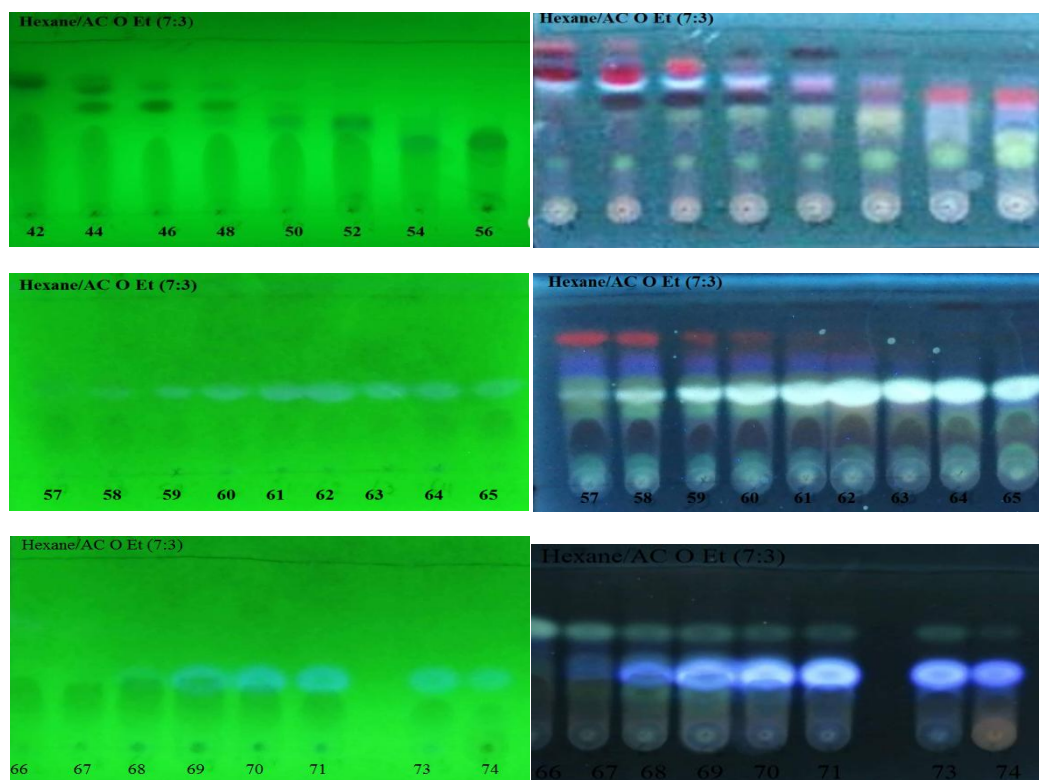
Tableau II.01 : résultats de la colonne chromatographique

Tubes	Eluant (%)		Volume d'éluant	Observation
	Hexane	ACOEt		
1-3	100	/	3V	/
4-16	90	10	3V	Mélange séparable
17-35	80	20	3V	Mélange séparable (tache noir, tache rouge ,tache jaune claire sous UV 365 )+ précipitation
36-48	70	30	3V	Mélange séparable (tache mauve claire, tache verte ,tache rouge, tache jaune sous UV 365 ) + précipitation
49-60	60	40	3V	Mélange séparable
61-62	50	50	3V	Mélange séparable (tache noir, tache jaune sous UV 365 ) + précipitation
73-74	/	100	1V	Couleur marron

Le suivi de la colonne a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice, les fractions sont regroupées selon la similitude de leur profil chromatographique en couche mince. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium avec plusieurs systèmes.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm). Les lots de même composition sont rassemblés, on obtient ainsi 13 fractions.





**UV 254**

**UV 365**

**Figure II.08 :** les plaques CCM des sous fractions 26 jusqu à 74

Le tableau II.02 rassemble les résultats de regroupement des fractions.

**Tableau II.02 :** Le fractionnement de la colonne

Tubes	Eluant %		Fraction	La masse (g)	Observation
	Hexane	AC O Et			
1-3	100	/	F1	0,006	/
4-16	90	10	F2	0,078	Mélange séparable
17-21	80	20			
22-25	80	20	F3	0,223	tache noir violet sous UV 365 + cristaux jaune
26-29	80	20	F4	0,607	Mélange separable (tache jaune , tache noir violet sous UV 365) + précipitation
30-35	80	20	F5	0,522	Mélange séparable



<b>36-39</b>	70	30			
<b>40-43</b>	70	30	F6	0,343	Mélange séparable
<b>44-48</b>	70	30	F7	0,274	Mélange séparable (tache jaune , tache noir violet sous UV 365) + précipitation
<b>49-53</b>	60	40	F8	0,202	Mélange séparable
<b>54-56</b>	60	40	F9	0,155	Mélange séparable
<b>57-60</b>	60	40	F10	0,087	Mélange séparable
<b>61-65</b>	50	50	F11	0,282	Mélange séparable (tache jaune , tache noir violet sous UV 365) + précipitation
<b>66-70</b>	50	50	F12	0,479	Mélange séparable
<b>71-72</b>	50	50	F13	0,122	Couleur marron
<b>73-74</b>	/	100			
<b>La masse totale des fractions</b>				3,38 g	

### II.7. Séparation et purification des fractions

Parmi les fractions obtenues, on a procédé l'étude des fractions F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>11</sub>:

#### ➤ La fraction F<sub>3</sub>

L'analyse par plaque CCM de la fraction F<sub>3</sub> montre une tache de couleur noire violette sous lumière UV (365nm), on a procédé à un lavage de cette fraction afin d'obtenir un produit pur selon les étapes suivantes :

- La fraction + l'acétone, et on récupère le surnageant.
- La fraction + chloroforme et aussi on récupère le surnageant.

Après ces étapes le produit obtenu est sous forme des cristaux jaunes clairs visible a l'œil nue et garde toujours sa couleur noire-violette sous la lumière UV (365nm), nous a orienté vers une structure flavonique, donc un premier composé a pu être isolé à partir de cette fraction, qui est désigné par **P<sub>1</sub>**(m=0,004g).

## **Chapitre II      L'étude phytochimique de *l'Ononis Angustissima***

### ➤ La fraction F<sub>4</sub>

Le test chromatographique de la fraction F<sub>4</sub> sur couche mince de gel de silice éluée par le système :(Hexane/AcOEt : 7/3) a montré 2 spots dont un très intense (produit majoritaire ; couleur jaune sous UV365nm) et l'autre en faible quantité (couleur noir violet sous UV365nm) ,nous a orienté vers un structure flavonique.

La séparation sur chromatographie sur couche mince a donné le produit **P<sub>2</sub>**(m=0,003g). **P<sub>2</sub>** (cristaux jaunes, apparaît sous forme d'un spot unique (de couleur jaune), sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm.

### ➤ La fraction F<sub>7</sub>

Le teste chromatographique de la fraction F<sub>7</sub> sur couche mince de gel de silice éluée par les systèmes :(Hexane/AcOEt : 9/1, 8/2, 7/3, 5/5) a montré 3 spots dont un très intense (produit majoritaire ; noire-violette sous UV365nm) et l'autre en faible quantité, nous a orienté vers un structure flavonique. Les tests effectués ont montré que les meilleurs séparations sont obtenus avec le système (Hexane / Acétate d'éthyle : 5/5)

Après avoir trouvé le bon système, une masse de 0.2 g de cette fraction a été effectué sur une colonne de gel de silice comme phase stationnaire éluée par le système Hexane/AcOEt en gradient de polarité, comme une phase mobile.

Le tableau II.03 montre les résultats de cette colonne après regroupement des tubes selon les tests chromatographiques sur couche mince .

**Tableau II.03 : fractionnement de la colonne de la fraction F<sub>7</sub>**

Tubes	Eluant		Fraction	Masse(g)	Observation
	Hexane	AC O Et			
<b>1-3</b>	90	10	F <sub>7-1</sub>	/	/
<b>3-6</b>	90	10	F <sub>7-2</sub>	0,003	Mélange séparable
<b>7-9</b>	90	10	F <sub>7-3</sub>	0,005	Mélange séparable
<b>10-20</b>	90	10	F <sub>7-4</sub>	0,001	Mélange séparable(tache jaune sous UV 365 en faible quantité)
<b>21-26</b>	80	20	F <sub>7-5</sub>	0,0027	Mélange séparable
<b>27-30</b>	80	20	F <sub>7-6</sub>	0,170	Précipitation jaune (cristaux jaune), tache noir violet sous UV 365.
<b>31-32</b>	50	50			
<b>33-39</b>	50	50	F <sub>7-7</sub>	0,0020	Mélange séparable
<b>40-42</b>	0	100	F <sub>7-8</sub>	0.0012	Couleur marron

### ➤ **Traitement de sous fraction F<sub>7-6</sub> de la colonne**

L'analyse par CCM de la sous fraction F<sub>7-6</sub> montre une tache noir violette sous la lumière UV (365 nm). On a procédé à un lavage de cette sous fraction afin d'obtenir un produit pur selon les étapes suivantes :

- ✓ La sous fraction F<sub>7-6</sub> + chloroforme, et on récupère le surnagent
- ✓ La sous fraction + l'Hexane et aussi on récupère le surnagent.

Le reste est un précipité jaune sous forme des cristaux visible à l'œil nue et garde toujours sa couleur noir-violette sous la lampe UV (365nm), donc la fraction F<sub>7</sub> a ainsi mené au composé **P<sub>3</sub>** à l'état pur (m=0,140g).

### ➤ **La fraction F<sub>11</sub>**

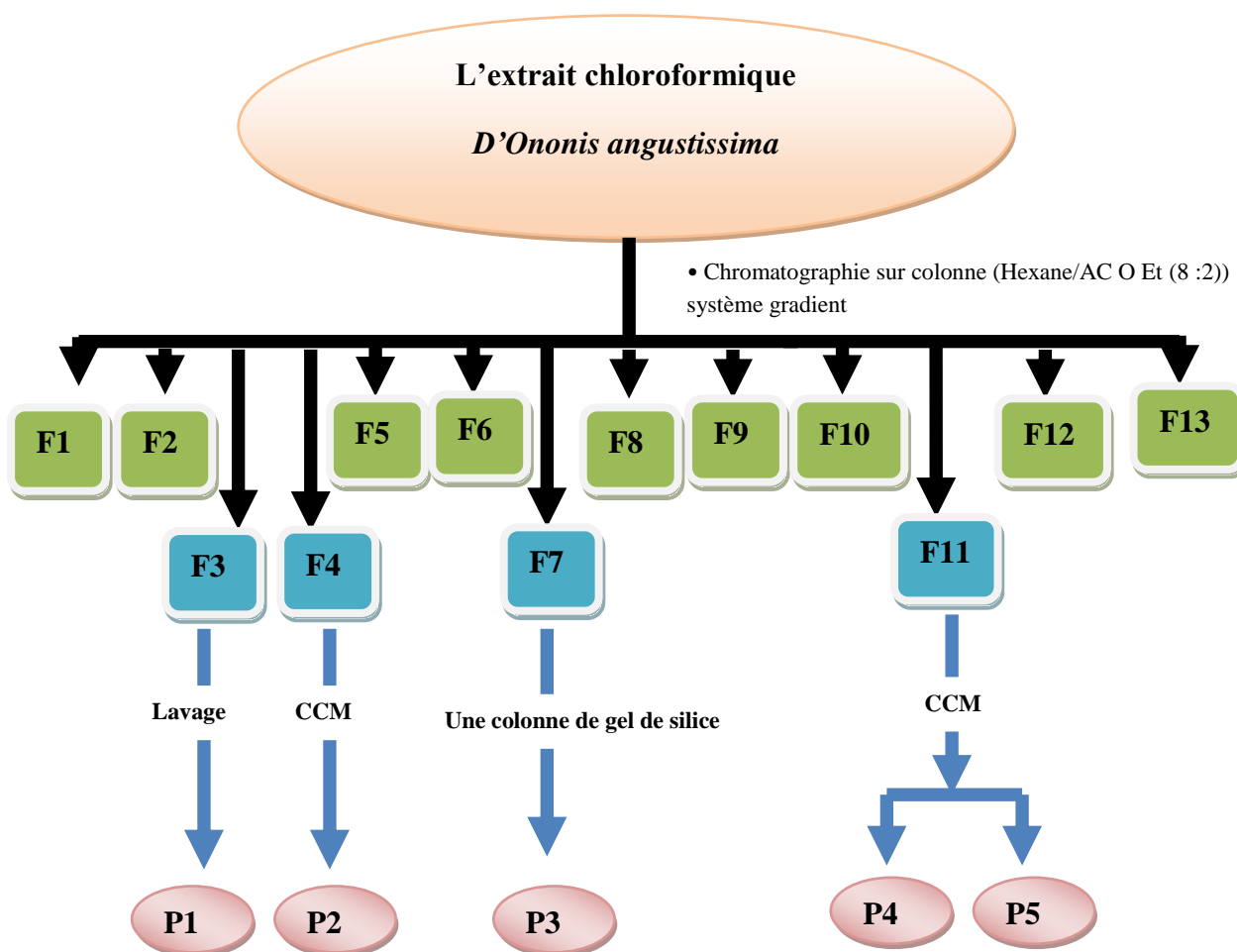
Le test chromatographique de la fraction F<sub>11</sub> sur couche mince de gel de silice éluée par le système :(Hexane/AcOEt : 5/5) a montré 2 spots dont un très intense (produit majoritaire ; couleur jaune sous UV365nm) et l'autre en faible quantité (couleur noir violet sous UV365nm), nous a orienté vers un structure flavonique.

La séparation sur chromatographie sur couche mince a donné les produits **P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>**.

Ainsi cette fraction a permis l'isolement de 2 produits à l'état pur.

- **P<sub>4</sub>** (cristaux jaunes,m=0,002g), apparaît sous forme d'un spot unique (de couleur jaune), sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm.
- **P<sub>5</sub>** (cristaux blancs,m=0,012), apparaît sous forme d'un spot unique (de couleur noir violet), sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm.

La figure suivante résume les travaux chromatographiques effectués sur la colonnes chromatographique et chromatographie sur couche mince.



**Figure II.09 :** Résumé des travaux chromatographiques effectués.

## II.8. Résultats et discussions

### II.8.1. L'extraction

Après une macération de la plante *Ononis angustissima*, extraction et évaporation, les macérats sont soumis à une décantation à froid pour les partitions entre solvants. Les fractions aqueuses sont soumises à des affrontements par l'éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, et le *n*-butanol. Après évaporation à sec on a obtenu les phases suivantes :





**Tableau II.04 :** Résultats de l'extraction liquide liquide

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
<i>Ononis angustissima</i> (250g)	Éther de pétrole (E)	0,50	0,2
	Chloroforme (C)	7,16	2,86
	Acétate d'éthyle (A)	4,08	1,63
	<i>n</i> -Butanol (B)	2,38	0,95



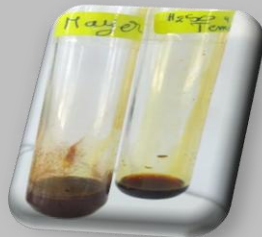

### II.8.2. Les résultats du screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante *ononis angustissima* par des réactions qualitatives. La détection de ces composés chimiques est basée sur des réactions de précipitation, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits contenant des substances naturelles, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau ci-dessous.

**Tableau II.05 : Résultats du screening phytochimique**

Composés recherchés	Présence/absence	Coloration	Résultats
<b>Test de bate-smith (test de flavan3, 4diols)</b>	+++	Rouge pourpre	
<b>Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones)</b>	+++	orange	
<b>Tannins (test de Gélatine)</b>	+	précipitation	
<b>Tannins (test de FeCl3)</b>	+++	Brune verdâtre	

## Chapitre II L'étude phytochimique de *Ononis Angustissima*

Test des Quinones	++	jaune	
Test des Anthraquinones	++	orange	
Alcaloïdes (test de Mayer)	+++	Orange + précipitation	
Alcaloïdes (test de Dragendorff)	+++	Orange + précipitation	

Les résultats sont interprétés comme suit : (+) présence, (++) présence moyenne, (+++) présence forte, (-) absence.

### II.8.3. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique, des extraits  $\text{CHCl}_3$  et  $n\text{-BuOH}$  de la plante *Ononis angustissima* a été réalisée par la méthode de Folin Ciocalteu [89]. L'acide gallique a été utilisé comme standard pour tracer une courbe d'étalonnage à des concentrations allant de 0 à 0.1 mg/ml.

## Chapitre II L'étude phytochimique de *l'Ononis Angustissima*

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en milligramme équivalent de l'étalon utilisé par gramme de l'extrait (mg Equivalent Acide Gallique / g de l'extrait) déterminés par l'équation de type  $y = ax + b$ .

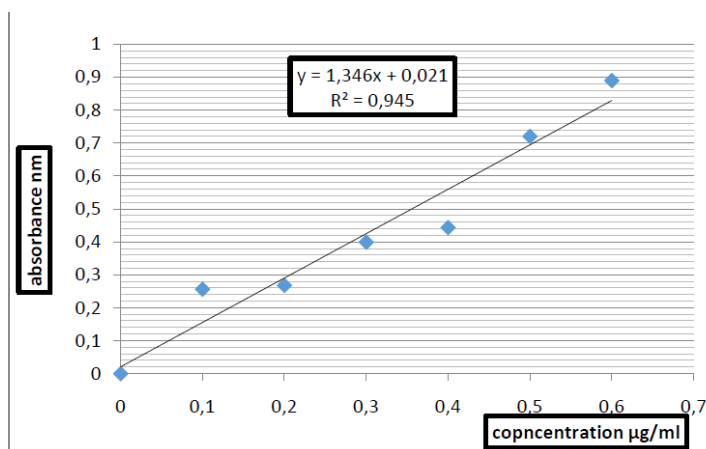


Figure II.10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

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

Tableau II.06 : Résultats du dosage des polyphénols

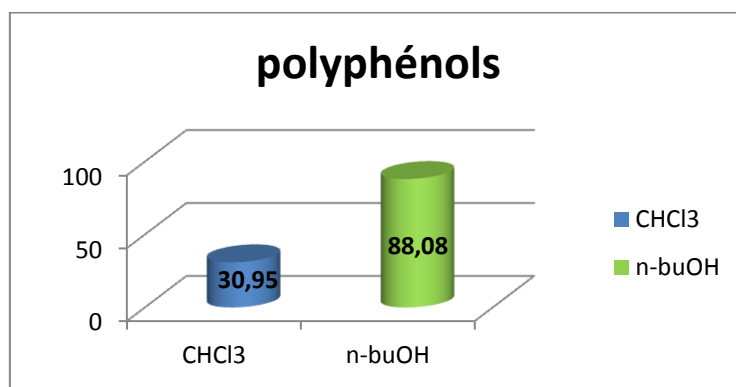
L'extrait	$\text{CHCl}_3$	n-BuOH
La teneur polyphénols (mg Eq /g)	30.95±0,006435	88.08±0,00997

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que les teneurs en polyphénol totaux varient considérablement entre les différents extraits.

Les teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait **n-BuOH** représente la teneur la plus élevée de l'ordre de **88,08 mgEAG /g**, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** de l'ordre de **30,95 mgE/g**.

Nous avons remarqué que l'extrait **n-BuOH** renferme plus de composés polyphénol que l'extrait **CHCl<sub>3</sub>**.

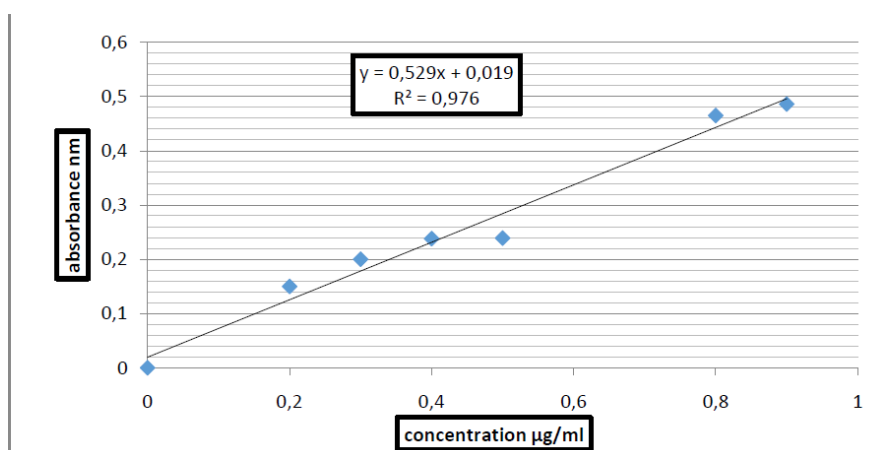
Les résultats sont résumés dans la figure suivante (**Figure II.11**)



**Figure II.11 :** Teneur polyphénols des extraits **CHCl<sub>3</sub>** et **n-BuOH**

### II.8.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium [90]. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en milligramme équivalent de Quercétine par gramme de l'extrait (mg Eq Q/g) déterminées par l'équation de type  $y = ax + b$ .



**Figure II.12 :** La courbe d'étalonnage de la quercétine

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

**Tableau II.07 :** Résultats du dosage des flavonoïdes

L'extrait	CHCl <sub>3</sub>	n-BuOH
La teneur en flavonoïdes (mg Eq /g)	275,58±0,006435	113,64±0,00997



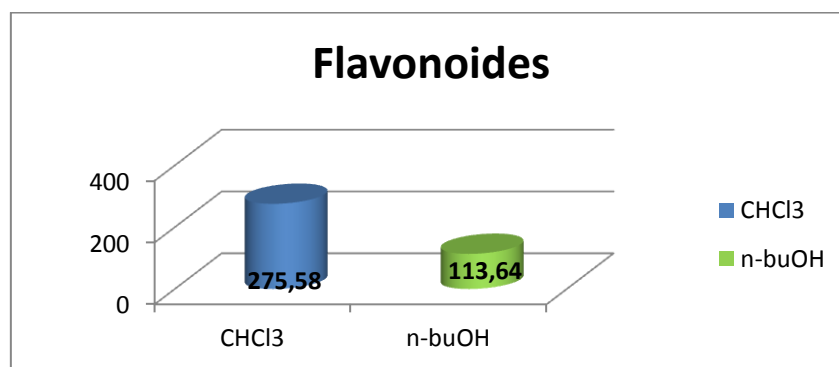
Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (**Tableau II.07**) révèlent que l'extrait **n-BuOH** contient une bonne quantité de flavonoïdes **113,64 mgEQ /g**, mais relativement faible par rapport à l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** qui est le plus riche en flavonoïdes **275,58 mg EQ/g**.

Nous avons remarqué que l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** renferme plus de composés phénoliques que l'extrait **n-BuOH**.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [91].



**Figure II.13** : Teneur en flavonoïdes des extraits **CHCl<sub>3</sub>** et **n-BuOH**

### II.8.5. Identification structurale du composé P1

La détermination de la structure du composé isolé P1 est basée sur l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H et UV-visible.

#### Fluorescence

Ce composé P1 de fluorescence noire violette sous la lumière de Wood (365 nm) laissant envisager une structure de type Flavone ou un Flavonol substitué en C3.

#### II.8.5.1. spectrophotométrie UV-Visible

L'étude de la série spectrale UV donne les indications suivantes : Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption, une bande (II) à 266 nm et une bande (I) à 335 nm nous orientant vers une structure de Flavone.

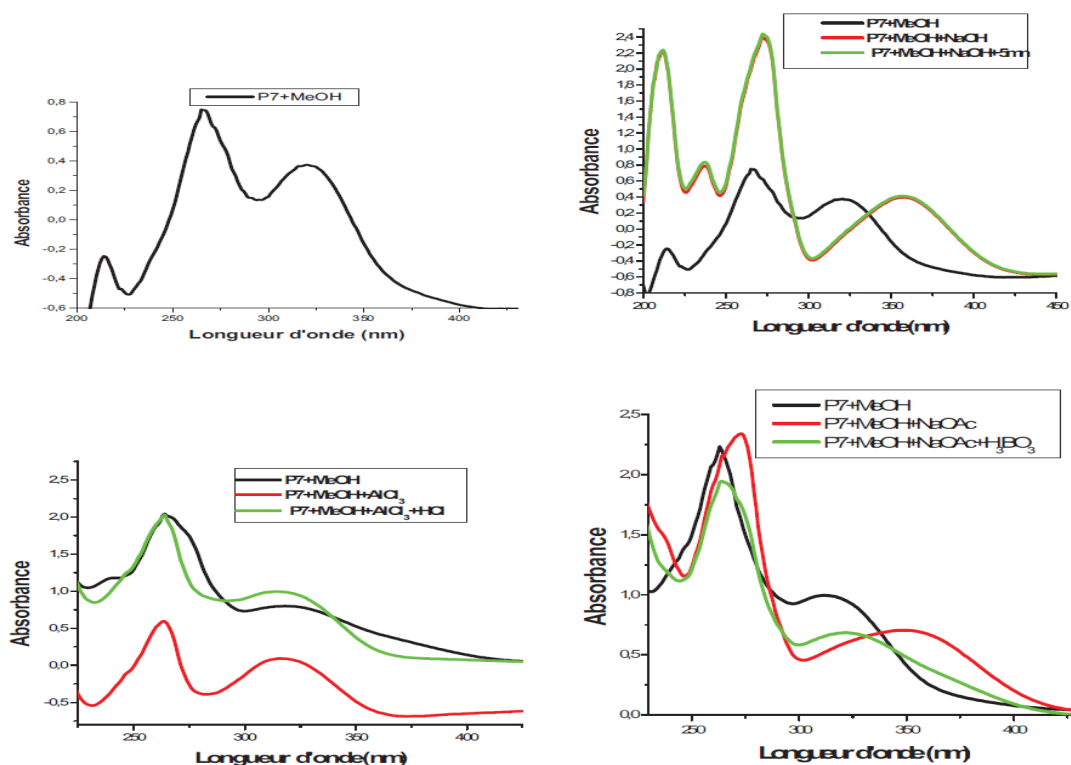
## Chapitre II L'étude phytochimique de *l'Ononis Angustissima*

- ✓ L'addition de NaOH provoque un effet bathochromique de la bande (I) ( $\Delta\lambda = +36$  nm) par rapport au spectre enregistré dans le méthanol indique l'absence d'un groupement OH libre en position 4'.
- ✓ L'addition du réactif  $AlCl_3$ , conduit à un déplacement hypsochrome de ( $\Delta\lambda = -17$  nm) de la bande (I), par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui indique l'absence d'un système ortho di OH en position 3',4' du cycle B
- ✓ Le spectre enregistré en présence de  $AlCl_3 + HCl$  signal en effet hypsochrome de la bande (I) ( $\Delta\lambda = -17$  nm) indiquant l'absence d'un système ortho di OH en position 3',4' du cycle B
- ✓ Le spectre enregistré dans l'acétate de sodium, NaOAc montre un faible déplacement bathochrome de la bande (II) de la flavone, qui traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 qui explique la présence d'un OR ( $O-CH_3$ ) en 6.
- ✓ L'addition de  $H_3BO_3$  donne un déplacement hypsochrome de la bande (I) ( $\Delta\lambda = -13$  nm) par rapport au spectre enregistré dans MeOH, qui prouve l'absence d'un ortho di OH sur les carbonnes 3',4' du cycle B.

Les séries spectrales UV (**Tableau II.08**) réalisées permettent la localisation des groupes hydroxyles (OH) et alkoxyles (OR) sur les noyaux A et B des flavonoides.

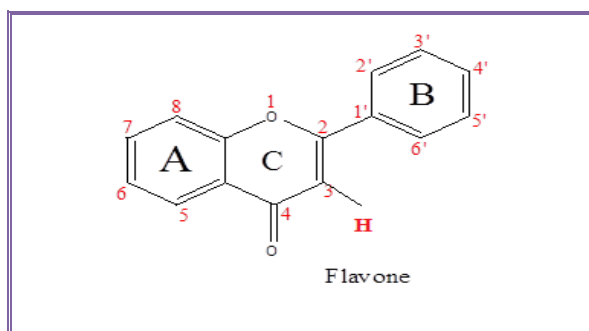
**Tableau II.08** : Donnée de la série spectrale UV du composé P1

REACTIFS	BANDE (I)	BAND (II)	COMMENTAIRES
MeOH	335	266	Flavone
+ NaOH	356	273	Absence de 4'OH 3-OH 7-OH
+ $AlCl_3$	318	264	Absence ortho di-OH sur le cycle B
+ $AlCl_3 + HCl$	318	264	Absence ortho di-OH sur le cycle B
+NaOAc	351	274	OH en 7
NaOAc + $H_3BO_3$	322	267	Absence ortho di-OH sur le cycle B



**Figure II.14 :** La série spectrale UV du composé P1

Selon les résultats de la série spectrale UV (**Figure II.14**), la structure partielle proposée pour le composé P1 est la suivante :



**Figure II.15 :** structure des Flavones

### II.8.5.2.Spectrométrie RMN

L'étude du spectre RMN-<sup>1</sup>H du composé P1 (**Tableau II.09**, **Figure II.16**) a permis de mettre en évidence la présence de :

- L'intégration d'un proton comme singlet au déplacement à  $\delta_H=6,50$  ppm,attribuable au H-8.
- l'intégration d'un proton comme singlet à  $\delta_H= 6,72$  ppm. Attribuable au H-3
- l'intégration de trois protons visibles comme singlets à  $\delta_H = 4,09$  ppm indique la présence d'un O-CH<sub>3</sub>

## Chapitre II L'étude phytochimique de *l'Ononis Angustissima*

-l'intégration de trois protons qui apparaissent comme multiplet à  $\delta_H= 7,65$  ppm attribuable au H-3', H-4', H-5'.

-l'intégration de deux protons qui apparaissent comme multiplet à  $\delta_H= 7,95$  ppm attribuable au H-2'et H-6'.

- l'intégration d'un proton comme singulet à  $\delta_H= 12,50$  ppm attribuable au H-5 (-OH).

L'examen de spectre RMN  $^1H$  (Figure II.16) ainsi que ces spectres étalés (Figure II.17) montrent la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier :

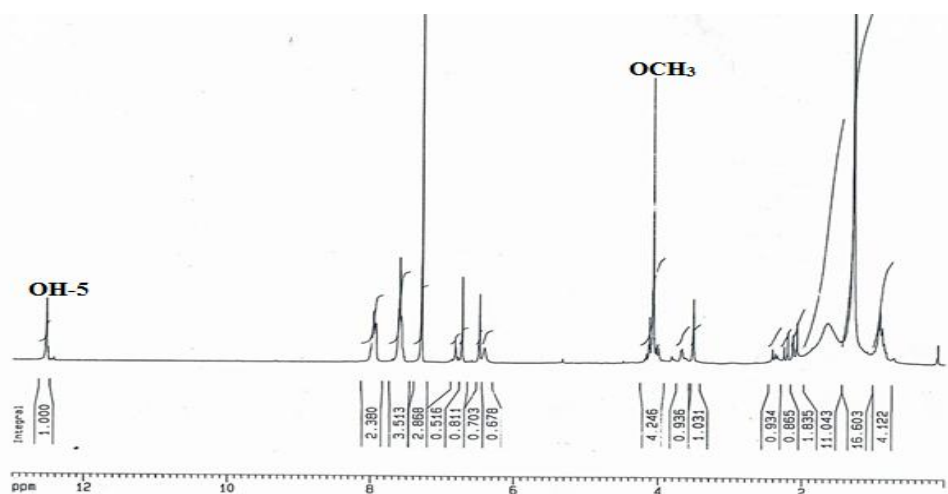


Figure II.16: Spectre RMN-1H du composé P1

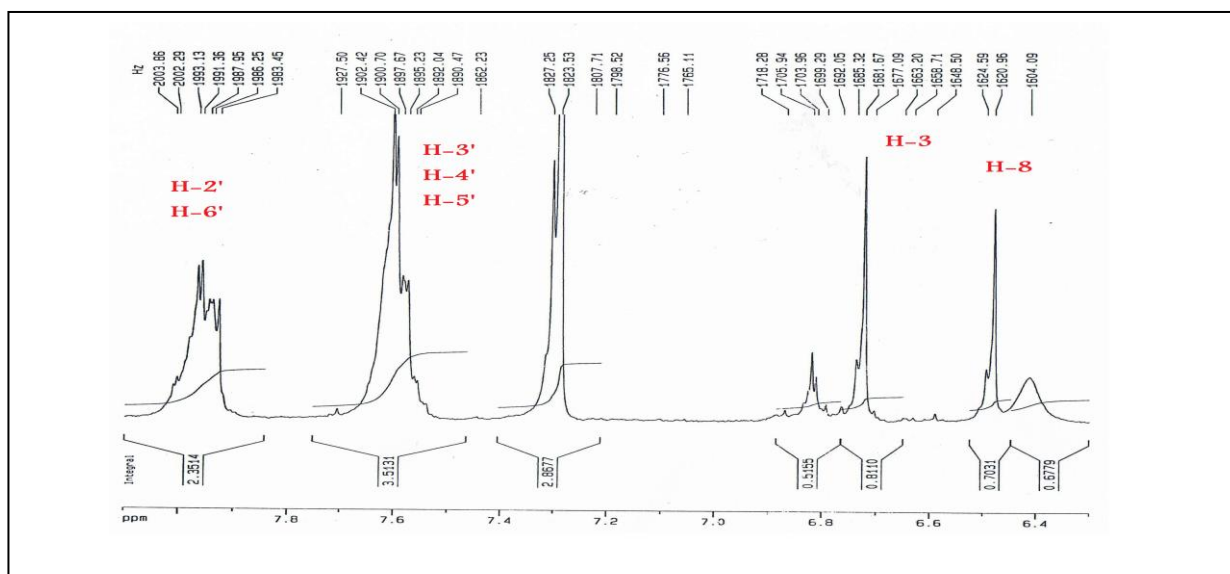
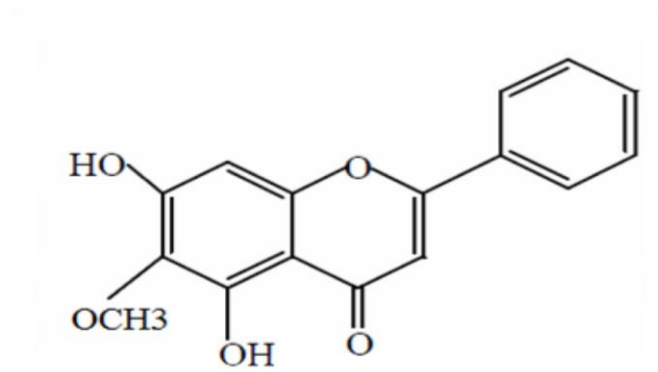


Figure II.17 : Spectre de RMN  $^1H$  (250 MHz) du composé P1 étalé (6,3 à 8,1 ppm)

**Tableau II.09 :** Donnée de spectrométrie RMN <sup>1</sup>H du composé P1

Position	RMN <sup>1</sup> H δ ppm	Multiplicité
H-2		
H-3	H    6,72	s
H-4	---	---
H-5	---	---
H-6	---	s
H-7	---	---
H-8	H    6,50	---
H-1'	---	---
H-2'	H    7,95	m
H-3'	H    7,61	
H-4'	H    7,59	m
H-5'	H    7,63	m
H-6'	H    7,93	m
O-Me	3xH   4,09	s
H-5-OH	H    12,55	s

La structure du composé P1 à donc pu être établis comme étant le **5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (6-methoxybaicalein)**. Et la structure est la suivante :



**Figure II.18 :** 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone (6-methoxybaicalein)

### III.1. Activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituants, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules [92]. La surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène peuvent engendrer de diverses pathologies ; cancer, vieillissement....etc.

Actuellement, La recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues des plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés, dont le DPPH est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les produits flavoniques testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule[93].

### III.2. Test au DPPH

C'est une activité du balayage des radicaux libre qui a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), c'est l'un des principaux essais employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbe comme antioxydants [94].

#### III.2.1. Principe

En présence des piègeurs de radicaux libre, le DPPH 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune.[95]

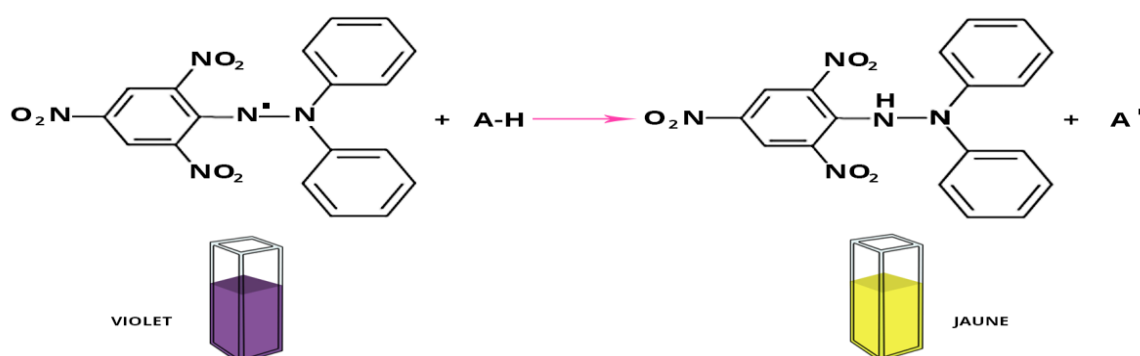


Figure III.01 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [96,97].

### III.2.2. Mode opératoire

L'activité antiradicalaire de l'extrait chloroforme de l'espèce *ononis angustissima* (Fabaceae), a été évaluée en utilisant la méthode du DPPH° (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl). L'extrait a été préparé dans le méthanol avec une concentration de 8 mg/mL. Ensuite, 30 µl de chacun de ces solutions ont été ajoutés à 3 mL de la solution de DPPH° (0,04mg/mL).

Après 30 min d'incubation dans une chambre noire à température ambiante, les absorbances des échantillons ont été mesurées avec un spectrophotomètre à 517 nm. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH° a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{PI (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

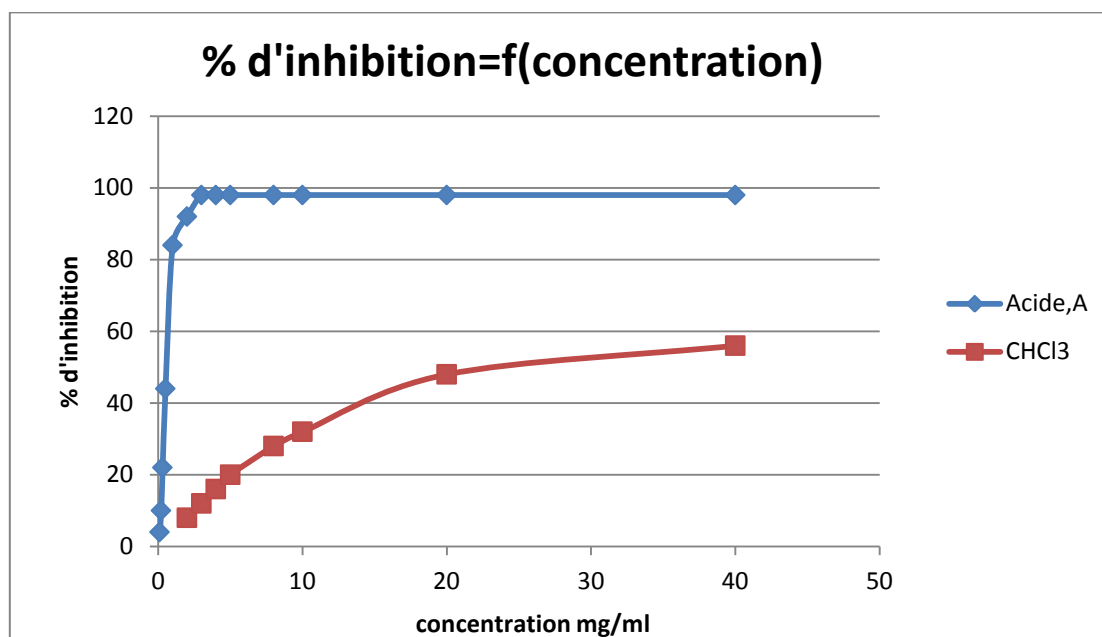
L'expérience a été répétée trois fois et les résultats ont été exprimés en valeurs des IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50% des radicaux DPPH°). Elle a été calculée à partir du graphe de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon en utilisant Microsoft Excel [88, 98].

### III.3. Résultats et discussions

L'activité antioxydante de *l'Ononis Angustissima* vis-à-vis du radical libre DPPH a été évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires.

L'activité anti radicalaire de tous les extraits étudiés a été exprimée en valeurs IC<sub>50</sub> (une valeur faible de IC<sub>50</sub> indique une forte capacité de l'extrait, tandis qu'une valeur élevée indique une faible activité de l'extrait).

Les résultats obtenus par ce test permettent de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour l'extrait chloroforme (**Figure III.02**). Cette courbe montre que l'extrait chloroforme ainsi que le standard (acide ascorbique) réduisent de manière dose dépendante le radical DPPH, C'est-à-dire, le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration l'extrait jusqu'à un seuil ou le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration.



**Figure III.02 :** Courbe représentant le % d'inhibition du DPPH de l'extrait chloroforme et l'acide ascorbique (standard) en fonction de la concentration.

❖ Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD

**Tableau III.01 :** Pourcentage d'inhibition de l'extrait CHCl<sub>3</sub> et acide ascorbique.

L'extrait	CHCl <sub>3</sub>	Acide ascorbique
IC <sub>50</sub> mg/ml	23,20 ±0,52 mg/mL	0,49±0,01 mg/mL

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

L'activité antioxydante de l'extrait chloroformique de l'*Ononis Angustissima* a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique du DPPH, les résultats seront comparés avec le standard qui est l'acide ascorbique.

Selon les résultats enregistrés dans le tableau au-dessus, l'extrait chloroformique de l'*Ononis Angustissima* est doté d'une activité antioxydante importante, leur IC<sub>50</sub> est **23,20 ±0,52 mg/mL**, mais relativement faible que celle d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de **0,49±0,01 mg/mL**.



### Conclusion générale

Le présent travail a porté sur l'étude qualitative, quantitative et biologique de la plante *Ononis Angustissima*, qui s'est faite par les différents tests de screening, dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, évaluation de l'activité antiradicalaire.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les alcaloïdes et les anthraquinones, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les extraits analysés montre que sont les plus riches en ces métabolites.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait **n-BuOH** représente la teneur la plus élevée de l'ordre de **88,08mgEAG/g**, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** de l'ordre de **30,95mgEAG/g**.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique en équivalent à la quercétine. Les résultats révèlent que l'extrait **n-BuOH** est plus riche en flavonoïdes **113,64mg EQ/g**, alors que l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** contient une bonne quantité, mais qui est relativement faible par rapport à l'extrait **n-BuOH**, à teneur de l'ordre de **275,58mgEQ/g**.

Le test d'étude de l'activité biologique antiradicalaire permis la valorisation de la capacité antioxydante de l'extrait **CHCl<sub>3</sub>** qui a été effectuée par le test du DPPH, a révélé que ces extraits possèdent un grand pouvoir de piéger ce radical avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de **23,20mg/ml**, mais cette activité reste relativement faible par rapport à l'antioxydant standard.

L'analyse qualitative par CCM et l'analyse quantitative par chromatographie sur colonne (CC) suppose la présence probable des flavonoïdes.

Cette étude qui a porté sur l'extrait chloroformique des parties aériennes de *Ononis angustissima*, a permis d'isoler 5 composés naturels dont un produit pur a été identifié grâce à la combinaison des données de RMN <sup>1</sup>H, de la spectroscopie UV-Visible, il s'agit de : 5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone (6-méthoxybaicalein).

L'isolement et la purification de ces métabolites secondaires ont été effectués par l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques (CCM, CC...).

## Conclusion générale

---

Leur détermination structurale a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D (1H), la spectroscopie UV ...

Notre étude a montré que la plante médicinale *Ononis Angustissima* . est très riche en différents composés métaboliques et présente une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisé dans le domaine pharmaceutique.

## Références bibliographiques

- [1]-**Gurib-Fakim. A., (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine.
- [2]-**Maurice. N., (1997).**L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle.
- [3]-**Jeun. JM , Annie.F , Chrystian. JL., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux.
- [4]-**Chaabi. M., (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla Baill. (Euphorbiaceae)*, *Anogeissuslio carpus Guill. Etperr. (Combrétaceae)*, *Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae)*. Thèse de doctorat en pharmaco chimie, Université Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine.
- [5]-**Bahorun. T, Gressier. B, Trotin. F, Brunet. C, Dine. T, Luyckx. M, Vasseur. J, Cazin. M, Cazin. JC, and Pinkas. M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations.
- [6]-**Nawasreh. M, Abu Zarga. M, Sabri. S, Al-khalil. S, Bomeister. E, Zeller. CP, Atta-Ur-Rahman., (2004).**A new anthranilic acid derivative from *ononis natrix* of Jordanian origin.
- [7]-**Ozenda. P., (1991).** Flore et végétation du Sahara. Paris : 3<sup>ème</sup> édition CNRS.
- [8] –**Wojciechowski. MF, Lavin. M, Sanderson. MJ., (2004).** A phylogeny of Legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many wellsupported subclades within the family.
- [9]-**Djabeur-Kaid-Harche. A, Taieb-Brabim-Bokhari. H , Selami. N, Sangare .M, et Mahboubi. S ., (2007).** Contribution à la connaissance de deux rétamés: Retam monosperma et R. reatam.
- [10]-**Quézel. P, Santa. S.,(1962).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales ,Tome I. Paris : Centre National de la Recherche Scientifique.
- [11]- **Wink. M., (2013).** Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae*).
- [12] –**Gadow. AV, Joubert. E, Hansmam. CF., (1997).** Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea, Food Chemistry.
- [13]-**De Witt.H ., (1963).** Les plantes du monde, Ed. Hachette, Paris.
- [14]-**Morale. S., (2011).** L'étude phytochimique et évaluation biologique de derris *ferruginea benth, (Fabaceae)*, université d'Angers.
- [15] -**Dupont. F, Guignard. JL .,(2007).** Abrégé de Botanique,14<sup>ème</sup> Ed. Masson, Paris.

- [16]-**Ndayishimiye. J.**,( 2011). Diversité, endémisme, géographie et conservation des *Fabaceae* de l'Afrique Centrale, Thèse de Docteur en Sciences: Service d'Ecologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale, Bruxelles: Ecole Inter facultaire de Bio ingénieurs.
- [17]-**Guignard. JI.**, (1994). Abrégé de botanique. 9ème édition Ed Masson.
- [18]-**Benabderrahmane. W.**, (2013). Recherche et détermination structurals de métabolites secondaires d'*Ononis Angustissima (fabaceae)* : Etude de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcoolique. Mémoire de magister en chimie organique. Université Mentouri Constantine.
- [19]-**Konigetein. G.**, (1994). L'international Code of Botanical Nomenclature ICBN.
- [20]-**Witchtl. M.**, Anton. R., (2003). Plantes thérapeutiques-tradition, pratique officinale , science et thérapeutique.
- [21]-**Mezrag. A.**, Bouheroum. M, Beghidja. N, Khalfaoui. A, Zaiter. L, Benayache. S, Benayache. F., (2013). More flavonoids from the ethyl acetate extract of *ononis angustissima* species.
- [22]-**Bouheroum. M.**, Zaiter. L, Benayache. S, Benayache. F, Bermejo. JB, Leon. F, Garcia. V., (2009). Four flavonoids from the aerial part of *ononis angustissima* species.
- [23]- **Boulos. L.**, (1983). In Medicinal Plants in North Africa; Reference Publications.
- [24]-**İpek Süntar.**, Ayşe Baldemir, Maksut Coşkun, Hikmet Keleş, Esra Küpeli Akkol., (2011). Journal of Ethnopharmacology.
- [25]-**Iserin. P.**, (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. édition Larousse, Paris.
- [26]- **Bellakhdar. J.**, (1997). La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press, Paris, France.
- [27]-**Bouakaz. I.**, (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*, Mémoire de magister.
- [28]-**Havsteen. BH.**, (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacol, Therapeut.
- [29]-**Bruneton. J.**, (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.
- [30]-**Delporte. G.**, Mascolo. N, Izzo. A., (1999). Life Scien .
- [31]-**Bruneton. J.**, (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème Ed Tec & Doc. Paris .

- [32]-**Kuhn. F**, Oehme. M, Romero. F, Abou-Mansour. E, Tabacchi. R., (2003). Differentiation of isomeric flavone/ isoflavone aglycones by MS2 ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO. *Rapid Commun Mass* .
- [33]-**Ghribi. L**, Waffo-Teguo. P, Cluzet. S, Marchal. A, Marques. J, Merillon. JM, Ben Jannet. H., (2015). Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorg Med Chem Lett*.
- [34]-**Wang. Q**, Ji. S, Yu. SW, Wang. HX, Lin. XH, Ma. TT, Qiao. X, Xiang. C, Ye. M, Guo. D., (2013). Three new phenolic compounds from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis*. *Fitoterapia*.
- [35]-**Shuhui. Z**, Linping. Z, Peng. G, Zhiyu. S., (2009) . *Food Chem*.
- [36]-**Kirmizigul. S**, Goren. N, Yang. SW, Cordell. GA, Bozok-Johansson. C., (1997). Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *Leiosperma*. *J Nat Prod*.
- [37]-**Nohara. T**, Kinjo. J, Furusawa. J, Sakai. Y, Inoue. M, Shirataki. Y, Ishibashi. Y, Yokoe. I, Komatsu. M., (1993). *Phytochemistry* .
- [38]-**Zhao. S**, Zhang. L, Gao. P, Shao. Z., (2009). Isolation and characterisation of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. *Food Chem*.
- [39]-**Yamamoto.H**, Ichimura. T, Tanaka. T, Inuma. M, Mizuno. M.,(1991). *Phytochemistry*.
- [40]-**Maged. SA.**, (2001). *Planta Med*.
- [41]-**Itokawa. H**, Yoshimoto. S, Morita. H., (1988). Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosana*. *Phytochemistry*.
- [42]-**Ruiu. S**, Anzani. N, Orru. A, Floris. C, Caboni. P, Alcaro. S, Maccioni. E, Distinto. S, Cottiglia. F., (2015). Methoxyflavones from *Stachys glutinosa* with binding affinity to opioid receptors: in silico, in vitro, and in vivo studies.
- [43]-**Cooper. JD**, Qiu. F, Paiva. NL., (2002). Biotransformation of an exogenously supplied isoflavonoid by transgenic tobacco cells expressing alfalfa isoflavone reductase. *Plant Cell Rep*.
- [44]-**Slade. D**, Ferreira. D, Marais. JPJ., (2005). Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*.
- [45]-**Agrawal. PK.**, (1989). *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier.
- [46]-**Le Gall. G**, DuPont. MS, Mellon. FA, Davis. AL, Collins. GJ, Verhoeyen. ME, Colquhoun. IJ., (2003). Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits.

- [47]-**D'Agostino. M**, De Simone. F, Zhong LZ, Pizza. C., (1992). Flavonol glycosides from *Tagetes elliptica*. *Phytochemistry*.
- [48]-**Hammami. S**, Ciavatta. ML, Ben Jannet. H, Cimino. G, Mighri. Z., (2006). Three phenolic and a sterol glycosides identified for the first time in *Matthiola longipetala* growing in Tunisia.
- [49]-**Higuchi. R**, Donnelly. DMX., (1977). *Pinus*. Part 2. Glycosides from *Pinus contorta* needles *Phytochemistry*.
- [50]-**Orjala. J**, Wright. AD, Behrends. H, Folkers. G, Sticher. O, Ruegger. H, Rali. T., (1994). Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*.
- [51]-**Barrero.AF**, Herrador.MM, Arteaga.P, Rodriguez-Garcia.I, and Garcia-Moreno.M., (1997) . Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subsp. *ramosissima*.
- [52]-**Berhanu Abegaz. M**, Bonaventure Ngadjui.T, Etienne Dongo, Bathelemy Ngameni, Mathew Nindi. N, Merhatibeb Bezabih., (2002). *Phytochemistry*.
- [53]-**Ghani. NA**, Ahmat. N, Ismail. NH, Zakaria. I, Zawawi NKNA., (2012). Chemical constituent and cytotoxic activity of *Polyalthia cauliflora* var. *cauliflora*.
- [54]-**Asakawa .Y.**, (1971). Chemical constituents of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae) II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes. *Bull Chem Soc Jpn*.
- [55]-**Dietz. VH**, Wollenweber. E, Favre-Bonvin. J, Smith. DM., (1981). Two flavonoids from the frond exudate of *Pityrogramma triangularis* var. *triangularis*. *Phytochemistry*.
- [56]-**Ogweno Midiwo.J**, Owino.NO, Dagne.E ., (1994). *Bull. Chem. Soc. Thiop*.
- [57]-**Tharworn Jaipetch**, Vichai Reutrakul., (1983). *Pittaya Tuntiwa chwuttikul*, Thawatchai Santisuk., *Phytochemistry*
- [58]-**Omid Sabzevari**, Giuseppe Galati, Majid Moridani.Y, Arno Siraki., (2004). Peter J O'Brien *Chemico-Biological Interactions*.
- [59]-**Kharazian.N** , and Rahiminejad.MR., (2009).*Iranian Journal of Science & Technology*.
- [60]-**Oliver Kayser**, Albrecht. F. Kiderlen, Tokai. J., (1999). *Exp Clin. Med*.
- [61]-**Farag Mohamed. A**, Deavours Bettina. E, de Fatima, Angelo, Naoumkina, Marina Dixon, Richard. A, Sumner, Lloyd. W., (2009). *Plant Physiology*.
- [62]-**Falleh. H**, Ksouri. R, Chaieb. K, Karray-Bouraoui. N, Trabelsi. N, Boulaaba. M, and Abdelly. C.,(2008) . "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities" .*C. R. Biologies*.

- [63]-**Viola. H**, Wasowski. C, Levi de Stein. M, Wolfman. C, Silveira. R, Dajas. F, Medina. JH. And Paladini. AC., (1995). "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects".
- [64]-**Schaechter .M**, Medoff. G, et Eisenstein. BI., (1999). "Microbiologie et pathologie infectieuse", 2.Ed. de Boeck, Paris.
- [65]-**Patel. RP**, Boersma. BJ, Crawford. JH, Hogg. N, Kirk. M, Kalyanaraman. B, Parks. DA, Barnes. S, and Darley-Usmar. V., (2001) "Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxyl radical scavenging". *Free Radical Biology & Medicine*.
- [66]-**Zanoli. P**, Avallone. R, and Baraldi. M., (2000). "Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin". *Fitoterapia*.
- [67]-**Dixon. RA**, and Ferreira. D., (2002). "Molecules of Interest: Genistein". *Phytochemistry*.
- [68]-**Ko .W**, Shib. CM, Lai. YH, Chen. JH. and Huang. HL., (2004). "Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships". *Biochemical Pharmacology*.
- [69]-**Knekt. P**, and Kumpulainen. J., (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases". *Am J Clin Nutr*.
- [70]-**Teixeira. S.**, (2002). "Biflavonoids: proanthocyanidins and quercetin and their potential roles in treating musculoskeletal conditions" *J Orthop Sports Phys Ther* .
- [71]-**Shoskes. DA**, and Zeitlin. SI., (1999). "Quercetin in men with category III chronic prostatitis" *Urology*.
- [72]-**Katske. F**, and Shoskes. DA., (2001). "Treatment of intestinal cystitis with a quercetin supplement". *Tech Urol*.
- [73]-**Anonyme.**, (1998). " Quercetin". *Altern Med Rev*.
- [74]-**Zeghad. N.**, (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économiques (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister. Université de Constantine.
- [75]-**Hamidi. A.**, (2012). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*.. Mémoire de Magistère. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [76]-**Bruneton. J.**, (1993). *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. 2ème édition Tec et Doc (Ed) Paris.

- [77]-**Dohou. N**, YamniK, Gmiran, Idrissi Hassani. LM., (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychroides*. Acta Botanica Malacitana.
- [78]-**Ribérreau. GP.**, (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris.
- [79]-**Rizk. AM.**, (1986). Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia.
- [80]-**Chenni. M.**, (2010). Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante Médicinale : *Bryonia dioica* Jasq. Mémoire de Magister . Université Essen-Oran.
- [81]-**Singleton. VL**, ORTHOFER. R., (1999). LAMUELA-RAVENTOS RM.
- [82]-**Škerget. M**, Kotnik. P, Hadolin. M, Hraš. AR, Simonič. M, and Knez. Ž., (2005). "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." Food Chemistry.
- [83]-**Topçu. G**, Ay. A, Billici. A, Sarihurkucu. C, Ozturk. M, and Ulubelen. A., (2007). Food Chemistry.
- [84]-**Ordóñez. AAL**, Gomez. JG, Vattuone. MA, Isla. MI., (2006). Food Chem.
- [85]-**Milane. H.**, (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- [86]-**Haenen. GR**, Arts. MJ, Bast. A, and Coleman. MD., (2006). "Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids." Environmental toxicology and pharmacology, 21(2), 191-198.
- [87]-**Bahri-Sahloul. R**, Ammar. S, Fredj. R, Saguem. S, Grec. S, Trotin. F, and Skhiri. F., (2009). "Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties." Pakistan Journal of Biological Sciences.
- [88]-**Öztürk. H**, Kolak. U, and Meric. C., (2011). Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Jurinea consanguinea* DC. Records of natural products.
- [89]- **Adesegun. SA**, Fajana. A, Orabueze. CI, Coker. HAB., (2007). Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis fascispsepala* CBCI (*Acantaceae*). Oxford Journal.
- [90]-**Ayoola. GA**, Coker. HAB, Adesegun. SA, ADepeoju-Bello. K Obaweya, Ezennia. EC , Atangbayila. To., (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of some selected Medicinal plants used For Malaria Therapy in southwestern Nigeria. Tropical journal of pharmaceutical research.
- [91]-**Aganga. AA**, and Mosase. KW., (2001). Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphismucropata*,



Sclerocaryabirrea, Kirkiaacuminata and Rhus lanceaseeds, Animal Feed Science and Technology.

[92]-**Cosio. C**, Vollenweider. P, Catherine. C., (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium - tolerant willow (*Salix viminalis*L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. Environmental and Experimental Botany.

[93]- **Madi. A.**, (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.

[94]- **Markowicz. BDH**, Saldanha. LA, Catharino. RR, Sawaya. ACHF, Cunha. I BS, Carvalho. PO, Eberlin. MN., (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESIMS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. Molecules.

[95]-**Maataoui. BS**, Hunyeyur. A, Hilalis., (2006) .Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). Lebanese Science Journal.

[96]- **Celiktas. OY**, Hames Kocabas. EE, Bedir. E, Verdar Sucan, Ozekt, Baser. KHC., (2007). Antimicrobial activities of methanolic extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry.

[97]- **Mohammedi. Z.**, (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université de Tlemcen.

[98]- **Koleva. II**, et al., (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques.

