



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Matière

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : chimie pharmaceutique

Présenté et soutenu par :

MANA Reguia et MENACER Reguia

Le : Mercredi 26 JUIN 2019

Étude phytochimique de la plante « *Erythraea Centaurium Pers* »

Jury :

AGGOUNE Sihem	M.A.A	<i>Université Med Khider de Biskra</i>	<i>Présidente</i>
BENAKCHA Rachid	M.C.B	<i>Université Med Khider de Biskra</i>	<i>Rapporteur</i>
BOUCETTA Farida	M.A.A	<i>Université Med Khider de Biskra</i>	<i>Examineur</i>

Année universitaire : 2018-2019

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

*On exprime d'abord nos profonds remerciements à notre encadreur Monsieur **BENAKCHA RACHID**, pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour son soutien, son attention, ses bons conseils et pour ses qualités humaines.*

Pour tout cela on tient à lui exprimer toute notre gratitude.

*Nous tenons à remercier **AGGOUNE SIHAM** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.*

*Nos remerciements **BOUCETTA FARIDA** s'adressent aussi d'avoir accepté d'examiner notre travail*

Nous remercions vifs à et tous l'équipe de recherche du laboratoire

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Merci à tous.

DEDICACE

C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma profonde reconnaissance à :

À mes chers parents, mon père ALI et ma mère TIBA , pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

A ma chère tante Rachida

A mes grands-mères, qu'Allah prolonge son âge à mes frères :Abdel Aziz- Abdel Wahab - Abdel Rafea et la petite Areej

Et à toute ma grande famille, en particulier mes oncles et mes tantes, chacun en son nom.

A et mes grand-père et à ma grand-mère, que Dieu leur fasse miséricorde.

Sans oublier tous mes collègues de la division chimie pharmaceutique du lot 2019, en particulier ma binôme REGUIA MENACER et les deux amis KHADIDJA et IKRAME.

À tous mes professeurs qui ont pris la route et m'ont fourni des connaissances et des connaissances tout au long de mes études.

REGUIA MANA



DEDICACE

Je ne trouve aucun mot ou expression, qui vont exprimer mes vifs sentiments de gratitude et remerciements

Je dédie ce travail :

A mon père Mohammed « L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie. »

A ma mère Farida « Tu m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tous ce que je peux offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. »

A mes chers frères et sœurs Fatima Zahra, Ahmed, Abdeljalil, Abdennacer, Hawa, Mima et Dana pour leur affection, compréhension et patience.

A toute ma famille, et mes amis (Hayat, Chahira),

A mon binôme REGUIA MANA et toute sa famille.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible,

je vous dis merci.

REGUIA MENACER



Liste des figures

Figure 01 : Rameaux florifères. Grandes fleurs d'un rose vif.....	12
Figure 02 :5 pétales de la fleur.....	12
Figure 03 : squelette de base et numérotation adoptée des flavonoïdes.....	15
Figure04 : les diverses classes de flavonoïde.....	16
Figure05 : Squelette de base des flavonoïdes.....	22
Figure 06 : La biosynthèse des flavonoïd.....	23
Figure 07 : montage de filtration sous vide.....	34
Figure 08 : représente les principaux éléments d'une séparation CCM.....	38
Figure 09 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	40
Figure 10 : macération de la matière végétale.....	44
Figure11 : filtration de la matière végétale.....	44
Figure 12 : extrait hydro-alcoolique	44
Figure 13 : évaporation du filtrat	44
Figure 14 : l'extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole.....	47
Figure 15 : l'extraction liquide-liquide avec le chloroforme.....	47
Figure 16 : l'extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle.....	48
Figure 17 : l'extraction liquide-liquide avec le n-butanol.....	48
Figure 18 : l'extrait de chloroforme (en couleur jaune clair).....	49
Figure 19 : l'extrait d'acétate d'éthyle (en couleur vert clair).....	49
Figure 20 : l'extrait de n-butanol (en couleur jaune foncé).....	49
Figure21 :sys1 : Toluène/Ethanol/Méthyle Ethyle cétone (4/3/3) pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	51
Figure22 : sys2 :H ₂ O/Méthanol/ Méthyle éthyle cétone (0.1 /1/7) pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	51
Figure23 : sys 3 : H ₂ O / Ethanol/Butanol/Acide acétique (0.1 /1/1.5/3) pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	51
Figure 24 :sys1 Toluène/Ethanol/Méthyle éthyle cétone (4/3/3) pour l'extrait de n-butanol.....	52
Figure 25 : sys2 :H ₂ O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone (0.1 /1/7) pour l'extrait de n-butanol.....	52
Figure 26 : sys 3 : H ₂ O / Ethanol/Butanol/Acide acétique (0.1 /1/1.5/3) pour l'extrait de n-butanol.....	53
Figure 27 : l'extrait d'acétate 'éthyle dilué.....	54
Figure 28 : l'extrait de n-butanol dilué.....	54
Figure 29 : Microscope de bactérie Staphylococcus aureus.....	56

Figure 30 : Microscope de bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figure31 : Microscope de bactérie <i>E.coli</i>	58
Figure 32 : la bactérie <i>E.coli</i>	58
Figure 33 : de milieux stériles.....	59
Figure 34 : gélose Mueller-Hinton.....	60
Figure 35 : boîtes de gélose Mueller-Hinton.....	60
Figure 36 : les suspensions bactéries préparés.....	60
Figure37 : les disques imbibés dans les extraits.....	61
Figure 38 :la stérilisation de l'anse de platine.....	61
Figure39 : extraction des bactéries en suspension.....	62
Figure 40 : technique d'ensemencement.....	62
Figure 41 : déposition des disques.....	63
Figure 42 : les boîtes de pétri dans l'étuve.....	63
Figure43 : les zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'ethyle testée par <i>E. Coli</i> , <i>Pseudo</i> et <i>Staph</i>	64
Figure44 : les zones d'inhibition de l'extrait de n-butanol testée par <i>E. Coli</i> , <i>Pseudo</i> et <i>Staph</i>	65

Liste des tableaux

Tableau 01: Données taxonomiques.....	10
Tableau02 : principale classe des flavonoïdes.....	17
Tableau03 : regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.....	24
Tableau04 : Principales caractéristiques des spectres UV-Visible des flavonoïdes.....	40
Tableau05: Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs	41
Tableau06: Certaines propriétés physiques et chimiques des solvants utilisées dans la décantation.....	46
Tableau 07: système d'élution pour l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol.....	50
Tableau 08: les valeurs de R_f de l'extrait d'acétate d'éthyle.....	52
Tableau 09 : les valeurs de R_f de l'extrait de n-butanol.....	53
Tableau 10 : identification de matériel de laboratoire.....	59
Tableau 11 : diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	64
Tableau 12 : diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de n-butanol.....	65

Liste des schéma

Schéma01 : Schéma de l'extraction avant et après la macération.....	33
Schéma02 : schéma de l'évaporateur rotatif.....	37
Schéma 03 : schéma générale de protocole de l'extraction.....	45
Schéma 04 : protocole de dilution des extraits.....	54

Liste des abréviations et symboles

ADN : acide désoxyribonucléique

ADV : Adénovirus

C: Carbone

CC : Chromatographie sur Colonne.

CCM : chromatographie sur couche mince

c : concentration

E.coli : Esherichia coli

EGCG : (-)-epigallocatechin gallate - (-)-épigallocatechine gallate

H₂O : Eau

h : heur

H : hydrogène

HIV : Human Immunodeficiency Virus.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HV : Herpes Virus

IR : Infra-rouge

g : Gramme

LDL : Low Density Lipoprotein.

MH : Mueller Hinton agar ou bouillon

Min :Minute

mm : millimètre

nm : nanomètre

O : oxygène

OCH₃ : méthoxyle

OH : Radical libre hydroxyle

Pseudo : Pseudomonas aeruginosa

R_f : rétention frontale

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SLE : extraction solide-liquide

Staph : Staphylococcus aureus

TPA : adenosine triphosphate - adénosine triphosphate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

UV : ultraviolet

V : Volume

µl : microlitre

¹³C : Carbone 13

¹H ; Proton

°C : Température en degrés Celsius

% : Pourcentage

v/v : Volume/ Volume

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des schémas

Liste des abréviations et symboles

Introduction générale1

Chapitre I l'étude bibliographique de la plante

I.1.La phytothérapie	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Utilisation thérapeutique	4
I.1.3. Les avantages de phytothérapie	4
I.2. Le pharmacognosie	4
I.3. Plant médicinales	5
I.3.1. Définition des plantes médicinales	5
I.3.2. Les éléments actifs des plantes	6
I.3.2.1. les phénols	6
I.3.2.2. les huiles essentielles	6
I.3.2.3. les flavonoïdes	6
I.3.2.4. les tanins	7
I.3.2.5. les anthocyanes	7
I.3.2.6. les anthraquinones	7
I.3.2.7. les coumarines	7
I.3.2.8. les saponines	8
I.3.2.9. les glucosides cardiaques	8
I.3.2.10 les glucosides cyanogéniques	8
I.3.2.11. les alcaloïdes	8
I.3.2.12. les vitamines	9
I.3.2.13. les terpénoides	9
I.3.3. Conservation des plantes médicinales	9
I.3.3.1. Séchage	9
I.3.3.2. Conservation	10

I.4. Présentation générale de la plante a étudié	10
I.4.1.Historique	10
I.4.2. Taxonomie de l'espèce	10
I. 4.3. Description générale	11
I.4.4. Culture.	12
I.4.5. Récolte et conservation	12
I.4.6. Indications thérapeutiques	13
I.4.7. Composition de la petite centaurée	13
I.4.7.1. Parties utilisées	13
I.4.7.2. Principes actifs	13
Remarque	13

Chapitre II les flavonoïdes

II.1.Généralités	14
II.2.Définition	14
II.3.Structure chimique	14
II.4.Classification	15
I.5.La biosynthèse	22
II.6.Localisation	24
II.7.Distribution	24
II.8.Propriétés des flavonoïdes	25
II.8.1.Propriétés Physico-Chimiques des flavonoïdes	25
II.8.1.1.Solubilité et l'extraction	25
II.8.1.2.Dosage	25
II.8.2 : Propriétés biologiques des flavonoïdes	26
II.8.2.1.Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire	26
II.8.2.2.Propriétés des flavonoïdes contre le cancer	26
II.8.2.3.Propriétés antivirale des flavonoïdes	27
II.8.2.4. Propriétés cardioprotectrice des flavonoïdes	27
II.8.2.5.Propriétés antioxydantes	28
II.8.2.6.Propriétés antibactériennes	29
II.8.2.7.Propriétés antiallergiques	29
II.8.2.8.D'autres effets biologiques	30
II.9.Biodisponibilité des flavonoïdes	30
II.10.L'intérêt des flavonoïdes	30

III.1.Extraction, isolement, purification et analyses structurales des flavonoïdes	33
III.1.A. patrie théorique	33
III.1.A.1. Extraction des flavonoïdes :	33
III. 1.A.1.1. Extraction solide-liquide:	33
III.1.A.1.1.1.principe	33
III.1.A.1.1.2. Extraction par macération	33
III. 1.A.1.1.3. Filtration	34
III. 1.A.1.1.4. Filtration sous vide	34
III. 1.A.1.2. Extraction liquide-liquide	34
III. 1.A.1.2.1.Principe	35
III. 1.A.1.2.2. La décantation	35
III. 1.A.1.3. L'évaporation des extraits	36
III. 1.A.1.3.1. Principe de l'évaporateur rotatif	36
III.1.A.2. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince	37
III. 1.A.2.1. Principe	38
III. 1.A.2.2 Appareillage	38
III.1.A.2. 3.Autres méthodes chromatographie :	39
III. 1.A.2. 3.1. Chromatographie sur colonne	39
III. 1.A.2. 3.2. La chromatographie sur papier Wathman	39
III. 1.A.3. Caractéristiques spectrophotométrique :	39
III. 1.A.3.1. Spectrophotométrie UV-visible	39
III. 1.A.3.2. Spectrométrie de masse	42
III. 1.A.3.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	42
III. 1.A.3.4. Spectroscopie infrarouge (IR)	43
III.1.B. Mode opératoire	43
III.1.B.1. Extraction solide-liquide	43
III.1.B.2.Extraction liquide-liquide	46
III.1.B.2.1. Extraction par l'éther de pétrole	46
III.1.B.2.2. Extraction par le chloroforme	47
III.1.B.2.3. Extraction par l'acétate d'éthyle	47
III.1.B.2.4. Extraction par n-butanol	48
III.1.B.3. L'évaporation des extraits	49
III.1.B. 4. Chromatographie sur couche mince CCM	50
III.2. Etude de l'activité antibactérienne des extraits	55

III.2.1. identification des souches bactériennes	55
III.2.1.1. classification des bactéries	55
III.2.1.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	55
III.2.1.3. Détermination de l'activité antibactérienne	58
III.2.1.3.1. Préparation de la boîte pétrie	60
III.2.1.3.2. Incoulum	60
III.2.1.3.3. Préparation des disques	61
III.2.1.3.4. Ensemencement d'une gélose	61
Remarques	64
Résultats Discussion	64
<i>Conclusion générale</i>	67
<i>Référence bibliographique</i>	
<i>Annexes</i>	
<i>Résumé</i>	



**INTRODUCTION
GENERALE**

*CHIMIE
INTRODUCTION*

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes ont été et sont toujours connus comme étant une source importante de médicaments.

En effet, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont (ou est) responsable(s) de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique [1]. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine.

Afin de donner un sens sinon valoriser ce genre de travail de recherche, autant essayer de choisir une espèce de plante utilisée dans un domaine tel que la médecine traditionnelle, la cosmétologie ou autre. Ainsi, l'occasion se présente afin de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales (Sahara, montagne, milieu aquatique) ou encore l'endémisme [2].

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, etc....), le travail de phytochimiste concerne essentiellement l'isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé quoique ce dernier a tellement évolué ces dernières années.

L'Algérie compte dans sa flore un grand nombre de plantes médicinales appartenant à des familles variées, notre choix s'est porté particulièrement sur une espèce de la famille des Gentianaceae.

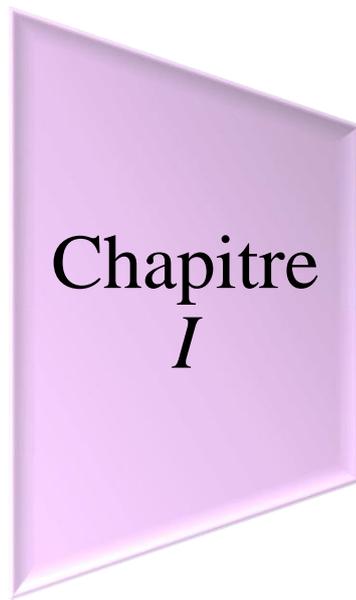
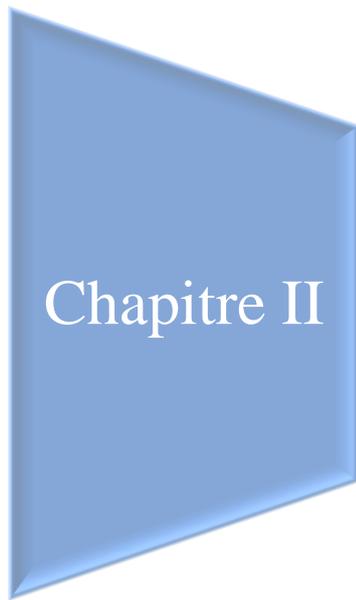
Notre présent travail est orienté vers l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurium erythraea*, et consiste en l'extraction, les tests CCM et l'activité antibactérienne des métabolites secondaires en l'occurrence les flavonoïdes et qui est présenté comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique concernant les plantes médicinales (*Centaurium erythraea*), sa classification botanique, l'intérêt biologique de leurs espèces et leurs métabolites secondaires les plus courants.

Introduction générale

- Le second chapitre renferme une étude bibliographique des flavonoïdes, les différents squelettes flavoniques, leur biosynthèse ainsi que leurs propriétés biologiques.

- Le dernier chapitre sera consacré à la présentation des différentes méthodes de séparation et d'identification, des techniques d'isolement, et de purification des flavonoïdes des plantes médicinales, et l'activité antibactérienne. Ainsi que la partie expérimentale de notre espèce *Centaurium erythraea* et les interprétations des résultats obtenus, suivi d'une conclusion générale.



L'étude bibliographique de la plante



I.1. La phytothérapie

I.1.1. Définition

La phytothérapie est un terme inspiré du grec « phytos » qui signifie « plantes » et « thérapie » qui signifie « traitement ». Elle fait partie des « médecines douces ».

La phytothérapie a recours à des substances médicalement actives prélevées à partir des plantes récoltées à cet effet. Les produits de phytothérapie sont fabriqués à partir de n'importe quelle partie de la plante, mais ils sont le plus souvent élaborés à partir de ses feuilles, ses racines, ses graines ou ses fleurs. Selon la plante utilisée, ces produits sont soit pris sous la forme d'une pilule ou d'un liquide, soit inhalés ou appliqués sur la peau.

On fait souvent la promotion des herbes médicinales en mettant l'accent sur le fait qu'elles agissent en douceur et qu'elles ne sont pas toxiques. Cela ne signifie pas pour autant que les plantes médicinales ne provoquent jamais d'effets secondaires ou qu'elles n'interagissent avec aucun autre traitement pharmaceutique ou phytothérapeutique. Il faut se renseigner sur les plantes médicinales, quelles qu'elles soient, pour vérifier leur innocuité et leur efficacité.

Parler des plantes médicinales et de leurs vertus est d'une importance capitale pour l'être humain. Pour la survie sanitaire de sa lignée, l'homme doit cultiver, protéger et mieux connaître son environnement premier qui est la nature. « Les plantes nous offrent gratuitement plus de composés nouveaux que tous les Chimistes du monde ne pourraient jamais en synthétiser pendant mille ans d'efforts...

Non seulement les composés fabriqués par les plantes sont infiniment plus variés que ceux dont nous disposons à l'heure actuelle; mais ils sont toujours mieux tolérés par l'organisme, parce qu'ils sont le produit naturel de la chimie de la vie... » [3]. Mais il faut faire attention car les plantes se font plus rares et elles sont en réel danger [4].

La phytothérapie semble être une discipline parfaitement connue. Malgré la clarté de sa définition, la phytothérapie est souvent confondue avec l'homéopathie ou du moins sans faire ressortir les différences. La phytothérapie existe depuis que le monde est monde et tire ses ressources exclusivement des plantes en utilisant des posologies courantes et classiques.

L'homéopathie, par contre, est une discipline d'apparition récente, introduite par **Hahnemann**, il y a deux siècles environ; qui consiste à traiter les maladies par l'administration de produits issus du règne animal, végétal ou minéral, qui produisent sur l'homme sain des symptômes semblables à ceux que l'on veut combattre chez l'homme malade et cela à doses infinitésimales [5].

I.1.2. Utilisation thérapeutique

La phytothérapie se donne un champ d'action sur de nombreux troubles, à titre préventif et curatif, dans des cas aigus ou pour modifier des terrains (tendances générales à être victime d'un type de maladie). Elle s'attache à traiter la cause du mal et non pas seulement ses symptômes. Son emploi s'appuie sur les connaissances traditionnelles, sur l'analyse des principes actifs des plantes et la compréhension de leur mode d'action, ainsi que sur les résultats constatés par les malades. Cependant, la phytothérapie n'a pas les mêmes bases scientifiques que la médecine moderne officielle, et il est impossible de la recommander pour des affections graves ni quand il existe un traitement moderne plus efficace.

I.1.3. Les avantages de phytothérapie

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le des traitements des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

On estime que 10% à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [6].

I.2. Le *pharmacognosie*

La *pharmacognosie* est l'une des branches les plus anciennes de la pharmacologie (officiel depuis 1969, CSP). Elle est pratiquée par les pharmaciens, et cible les ingrédients actifs naturels, animaux ou végétaux comme les plantes médicinales. Elle étudie des principes actifs des plantes :

- **Plante** : définir l'identité, morphologie, l'origine, les modes de production et leur influence sur la composition chimique.

- **Principes Actifs** : d'origine naturelle propriétés physico-chimiques (stabilité, solubilité, extractibilité, structure, réactivités, ...) et activités pharmacologiques.
- Connaissance de l'utilisation optimale des plantes et des produits qui en dérivent (indications, contre-indications, effets secondaires, interactions médicamenteuses, ...).
- Méthodes objectives de contrôle de la qualité des drogues végétales.

Les végétaux ou animaux, en totalité ou en partie, ou des dérivés, qui, après avoir subi la procédure de prélèvement, de préparation et de stockage peuvent servir de matière première brute pour l'obtention de substances médicamenteuses ou de la même substance sans activité pharmacologique, mais d'intérêt pharmaceutique.

Le terme dérive de deux mots grecs, *pharmakon*, la drogue, et *gnosis*, le savoir. Le pharmacognosie est devenu obligatoire dans les écoles brésiliennes de pharmacie en 1920 [7].

I.3. Plant médicinale

Depuis quelques années, le marché des thérapeutiques dites naturelles progresse, révélant un intérêt de plus en plus fort des patients à l'égard de la médication à base de plantes. Dans ce contexte particulier, afin d'harmoniser les pratiques au sein de l'Union européenne et de garantir la sécurité sanitaire, une directive européenne a été adoptée en 2004, autorisant la mise sur le marché de « médicaments traditionnels à base de plantes »

I.3.1. Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de **la Pharmacopée européenne (1433)** dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. l'étude de l'effet des plantes repose sur l'utilisation des parties les plus riches en métabolites secondaires telles que les feuilles, les graines, les racines, les fruits, les fleurs ou la totalité de la partie aérienne de la plante .

Elles sont utilisées depuis au moins 7.000 ans avant notre ère par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie.

Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents.

À noter qu'il a été observé chez des grands singes la consommation de certaines plantes à usage thérapeutique [8].

I.3.2. Les éléments actifs des plantes

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants présents dans cette plante; ils lui donnent ses effets curatifs. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante: ils représentent quelques pour-cent à peine du poids total de celle-ci, mais se sont eux qui en sont l'élément essentiel.

Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme [9].

I.3.2.1. les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides.

Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. La gaulthéne (*Caultheca palustris*) et le saule blanc (*Salix alba*) contiennent des acides glucosides phénoliques qui donnent, par distillation, des dérivés [9].

I.3.2.2. les huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie. Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine **terpénoïde** et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés. L'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), par exemple, est fortement antiseptique [9].

I.3.2.3. les flavonoïdes

Les composés flavoniques sont des polyphénols naturels très répandus dans la famille des composés ou beaucoup de travaux ont été réalisés [], plus d'une trentaine de types flavonoidiques ont pu être identifiés dans cette famille. On note aussi plus de 87 structures qui ont été identifiées dans la seule classe des flavones et plus de 153 structures dans la classe des flavonols [10].

I.3.2.4. Les tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail. Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure. Les écorces de chêne (*Quercus*) et d'acacia (*Acacia catechu*) sont riches en tanins[9].

I.3.2.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleue, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux. La mûre sauvage (*Rubus fruticosus*), la vigne rouge (*Vitis vinifera*) et l'aubépine (*Crataegus oxyacantha*) contiennent toutes des quantités appréciables.

I.3.2.6. Les anthraquinones

Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*), qui, toutes deux, agissent sur la constipation. Elles ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations environ dix heures après la prise. Elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal.

I.3.2.7. Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du méhiot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang alors que les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le céleri (*Apium graveolens*), soignent les affections cutanées et que la khelline de la khella (*Ammi visnaga*, p 62) est un puissant vasodilatateur coronarien.

Certaines foranocoumarines sont photosensibilisantes, elles ont des effets carcinogènes qui tendent à diminuer l'emploi de ces substances dans le traitement des maladies de la peau telles que le psoriasis [11].

I.3.2.8.les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoides. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone), et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdes à partir desquels on synthétisa la pilule contraceptive. Les saponines triterpénoides, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) et la primevère (*Primula vernalis*), ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments.

I.3.2.9.les glucosides cardiaques

Présents dans de nombreuses plantes médicinales, telles que les digitales laineuse et pourprée (*Digitalis lanata* et *Digitalis purpurea*) et le muguet (*Convallaria majalis*), les glucosides cardiaques comme la digitoxine, la digoxine et la convallotoxine ont une action directe et puissante sur le cœur. Ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement.

Ces glucosides sont également diurétiques. Ils contribuent à transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires.

I.3.2.10 les glucosides cyanogéniques

Bien que ces substances soient à base de cyanure, un poison très violent, elles ont à petites doses, un effet sédatif et relaxant sur le cœur et les muscles.

L'écorce du cerisier sauvage (*Prunus serotina*) et les feuilles du sureau noir (*Sambucus nigra*), qui en contiennent toutes deux, permettent de supprimer ou de calmer les toux sèches et irritantes. De nombreux noyaux de fruits en contiennent de fortes quantités de glucosides cyanogéniques, par exemple ceux de l'abricotier (*Prunus domestica*).

I.3.2.11.les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées généralement cycliques où l'azote est assez souvent incorporé dans un noyau hétérocyclique. Généralement les alcaloïdes ont des propriétés très

basiques, la plupart, ainsi comme leur nom l'indique ont une réaction alcaline, on peut les subdiviser en trois classes, alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes et pseudoalcaloïdes [12].

I.3.2.12.les vitamines

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le citronnier notamment (*Citrus limon*) contient des doses élevées de vitamine C et la carotte (*Daucus carota*) est riche en bêta-carotène (provitamine A). Le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*), par exemple, contient des doses élevées de vitamines B1, B2, C et E et de bêta-carotène tandis que l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) peut être considéré comme un complément vitaminique et minéral en tant que tel.

I.3.2.13.les terpénoïdes

Sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA par la voie de l'acide mévalonique, ils sont des hydrophobes généralement stockés dans les canaux à résine. Ils jouent un rôle médical, par exemple le taxol qui a des propriétés anticancéreuses, ou encore un rôle industriel comme la production de caoutchouc, mais beaucoup des terpénoïdes sont des poisons, comme les glucosides cardiotoniques qui peuvent provoquer des crises cardiaques.

I.3.3. Conservation des plantes médicinales

Il existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four. Un endroit chaud et sec est l'idéal. Poser toujours les plantes sur du papier journal. Une fois séchées, les plantes se conservent plusieurs mois dans un sac ou un pot en verre teinté ou dans un sac en papier kraft.

I.3.3.1. Séchage

Le séchage est une phase extrêmement importante dont la qualité du produit est conservée. Cette opération, qui permet d'éliminer l'humidité des végétaux, doit être effectuée immédiatement après la cueillette. Les plantes cueillies doivent être étalées dans une pièce bien aérée, sur des toiles de jute ou de coton, la différente espèce étant bien séparées. Sauf indication contraire, elles ne seront pas exposées directement aux rayons du soleil. En effet, elles risqueraient alors de perdre de nombreuses propriétés, à cause de la volatilisation de nombreuses substances.

Bien entendu, si les plantes sont salies par la terre ou autre, il sera nécessaire de les nettoyer, de les laver et de les sécher soigneusement. Cela est particulièrement vrai pour les racines, il est conseillé de couper ces dernières en petits morceaux pour en accélérer le séchage, mais aussi pour vous éviter la peine de les découper, une fois qu'elles auront séché et qu'elles auront donc durci à cause de la déperdition d'eau. Si la plante a été cueillie tout entière, on peut aussi l'étendre sur un fil

tendu, comme on le fait avec le linge. Tout au long de cette opération, qui peut durer jusqu'à une semaine, voire deux et il faut retourner périodiquement les plantes.

I.3.3.2. Conservation

Une fois que les plantes seront séchées, passez immédiatement à la phase de conservation, afin d'éviter que la poussière ne s'accumule inutilement. A cette fin, procurez-vous des sachets de papier, des boîtes en fer blanc, des sacs en plastique (sauf pour les espèces contenant des huiles étherées) et des bocaux en verre. Vérifier toujours, au bout de quelques temps, que la condensation ne s'est pas formée sur les parois des récipients car cela constitue un symptôme de mauvais séchage. Si vous voulez sauver votre cueillette, vous devrez immédiatement faire sécher à nouveau les plantes. Cela vaut également pour les plantes achetées dans les boutiques spécialisées (pharmacies, herboristeries).

I.4. Présentation générale de la plante à étudié

I.4.1. Historique

Le mot *Centaurium* vient du grecken taureion qui désignait dans la mythologie grecque un être hybride entre l'homme et le cheval. Les centaures étaient considérés comme fêrus en médecine. Selon Pline, le centaure Chiron aurait soigné avec cette plante son pied blessé par une flèche. La langue populaire transforma l'étymologie du mot en *centum aurei* (= cent pièces d'or). Cela donna en allemand «Hundertguldenkraut», encore utilisé au 16ème siècle. Il en résulta ensuite «Tausendguldenkraut» qui exprime encore mieux la haute estime dont jouissait la plante. A cause de son goût amer, les Romains l'appelaient *Herba felis terrae* qui signifie «herbe de la bile de terre». *Minus*, le nom de l'espèce, dérive du latin *minor* pour «petit» ou «mineur». On retrouve des traces de l'usage médicinal de la petite centaurée jusque chez les disciples d'Hippocrate (5^{ème} et 4^{ème} siècle av. J.-C.). Dioscoride la recommandait comme purgatif et emménagogue, ainsi que pour soigner les yeux et panser les plaies.

I.4.2. Taxonomie de l'espèce

Tableau 1. Données taxonomiques

Règne	Plantae
division	Magnoliopsida
Ordre	Gentianales
Famille	Gentianaceae

Genre	Centaurium
Nom scientifique	<i>Centaurium erythraea</i>
Noms communs	petite centaurée commune, petite centaurée rouge, érythrée, herbe à Chiron, fiel de terre, herbe au centaure, herbe à fièvre,
Noms anglais	<i>common centaury, European centaury</i>
Noms vernaculaires	Meraret el h'nech goustt el haïa, quanttarium es saghir, tikoukt, ,

I. 4.3. Description générale

Le genre *Centaurium* comprend environ 40 espèces réparties dans l'hémisphère Nord, l'Amérique du Sud et l'Australie. La Petite Centaurée pousse principalement dans les régions tempérées d'Europe, en Asie occidentale et centrale et en Afrique du nord-ouest. En Europe c'est une espèce menacée non seulement par suite des effets de l'industrialisation mais aussi parce qu'elle est très récoltée à des fins pharmaceutiques. La culture de la plante serait une bonne solution mais elle est difficile et onéreuse. Médicinalement on utilise les sommités fleuries. La drogue est sans odeur et a une saveur amère prononcée

Elle peut atteindre une hauteur de 10 à 50 centimètres, mais peut également se présenter sous la forme d'un coussin.

Les nombreux rameaux stériles sont étalés et forment un gazon plus ou moins tapissant sur le sol. Ils sont composés de feuilles opposées, rapprochées le long de la tige avec un limbe ovale-spatulé, arrondie, atténué en un court pétiole ou presque sessiles et marqué de 3 nervures dont celle du milieu fortement prononcée [13].

Les rameaux florifères sont quant à eux dressés à feuilles plus espacées, plus allongées, elliptiques oblongues et sessiles. Ces rameaux portent des inflorescences en cyme bipare lâches, de 1 à 6 grandes fleurs pédicellées, de 1.5 à 2 cm de diamètre d'un rose vif en pleine floraison (parfois blanche) .Dans certaines stations de la Hague, des individus à 18 fleurs ont été observés. Le type d'inflorescence de la Petite centaurée vivace induit la floraison dans un premier temps de la fleur centrale et dans un second temps la floraison des fleurs périphériques.



Figure 1 : Rameaux florifères. Grandes fleurs d'un rose vif

La corolle est formée le plus souvent par 5 sépales étroits, aigus et soudés sur leur demi-longueur et par 5 pétales ovales-arrondis et long de 8 à 9 mm réguliers, soudés et se divisant dans leur partie supérieure.



Figure 2 : 5 pétales de la fleur

I.4.4. Culture

La petite centaurée est propagée par graines ; mais on a remarqué que celle qui était cultivée était moins amère que celle qui pousse à l'état sauvage.

I.4.5. Récolte et conservation

Cette plante se récolte en juillet et août, époque de sa plus grande vigueur florale. Sa dessiccation doit s'opérer rapidement. Il faut l'envelopper dans des cornets de papier, afin de conserver la couleur et les propriétés de ses fleurs. Henry a observé que, parmi nos amers indigènes, la petite centaurée est d'autant plus active que sa floraison est plus avancée.

I.4.6. Indications thérapeutiques

La petite centaurée est utilisée pour la stimulation de l'appétit et pour favoriser la digestion. Elle est recommandée aux convalescents pour les aider à reprendre du poids. Elle permet de lutter contre la perte temporaire d'appétit, les problèmes digestifs et gastro-intestinaux peu importants. Elle stimule les sécrétions du foie et de l'estomac. Les substances amères stimulent l'activité de l'estomac de manière réflexe, favorisant la sécrétion des sucs gastriques. C'est un tonique général permettant de lutter contre la fatigue. Utilisation comme diurétique ou pour faire baisser la fièvre. Lutte contre les parasites intestinaux ; prévention des calculs biliaires ; problèmes hépatiques ; migraines.

Utilisation en application locale comme antiseptique, mais aussi pour faire disparaître les poux ou pour lutter contre la chute des cheveux. La gentianine, un composé alcaloïde, lui procure de fortes propriétés anti-inflammatoires. Dans certains cas de diabète, elle est utilisée comme stimulant du pancréas[14].

I.4.7. Composition de la petite centaurée

I.4.7.1. Parties utilisées

En phytothérapie, on utilise essentiellement les fleurs séchées.

I.4.7.2. Principes actifs

Hétérosides amers dont l'érythaurine ; la swertiamarine est transformée en gentianine dans l'organisme et a des propriétés sédatives. Polyphénols : acides phénols et flavonoïdes qui ont une action contre la fièvre. Alcaloïdes : gentianine. Triterpènes. Proche de la gentiane, la petite centaurée contient plusieurs principes amers à fonction lactone, des acides organiques, des dérivés phénoliques ainsi que la gentianine, un alcaloïde[14].

Remarque :

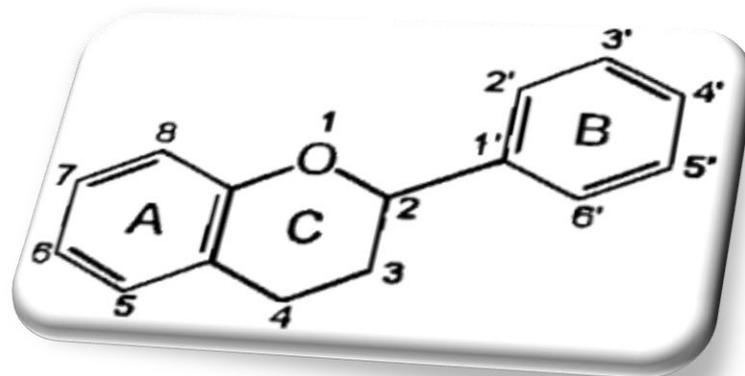
La petite centaurée est toxique à fortes doses.

Chapitre III

Chapitre
II

Chapitre I

LES FLAVONOÏDES



II.1.Généralités

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues dans le règne végétal. Les scientifiques en ont identifié plus de 8000, allant de molécules simples à des composés hautement complexes [15]. Leur accumulation dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à l'autre. On peut distinguer les différentes classes de polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base [16] :

- les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques).
- les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée
- les tanins et lignines.
- et plus rares, les coumarines et les stilbènes.

Les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections.

II.2.Définition

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes.

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [17].

II.3.Structure chimique

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [18]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 en

formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (figure 03)[19]

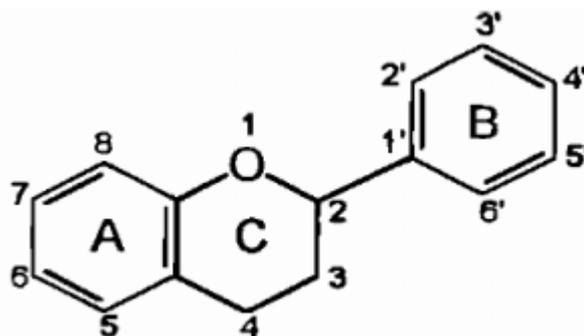


Figure 03 : squelette de base et numérotation adoptée des flavonoïdes

II.4. Classification

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, alors que les composés individuels au sein d'une même classe diffèrent par la substitution des cycles A et B [20]. Les principales classes de flavonoïdes sont représentées sur la figure.

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', et / ou 5'. Fréquemment, une ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont méthylés, acétylés, sulfatés ou prénylés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme d'O- ou C-glycosides. Les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides sont de loin les plus fréquents. Ils portent leurs substituant sur les groupements hydroxyles de la génine, généralement situé à la position 3 ou 7. Alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, généralement les C-6 ou C-8. Les sucres les plus rencontrés sont le rhamnose, le glucose, le galactose et l'arabinose. Deux disaccharides très courants sont aussi fréquemment trouvés, le néohesperidose et le rutinose. Les sucres sont souvent en outre substitués par des résidus d'acyles tel que l'acétate et le malonate [21].

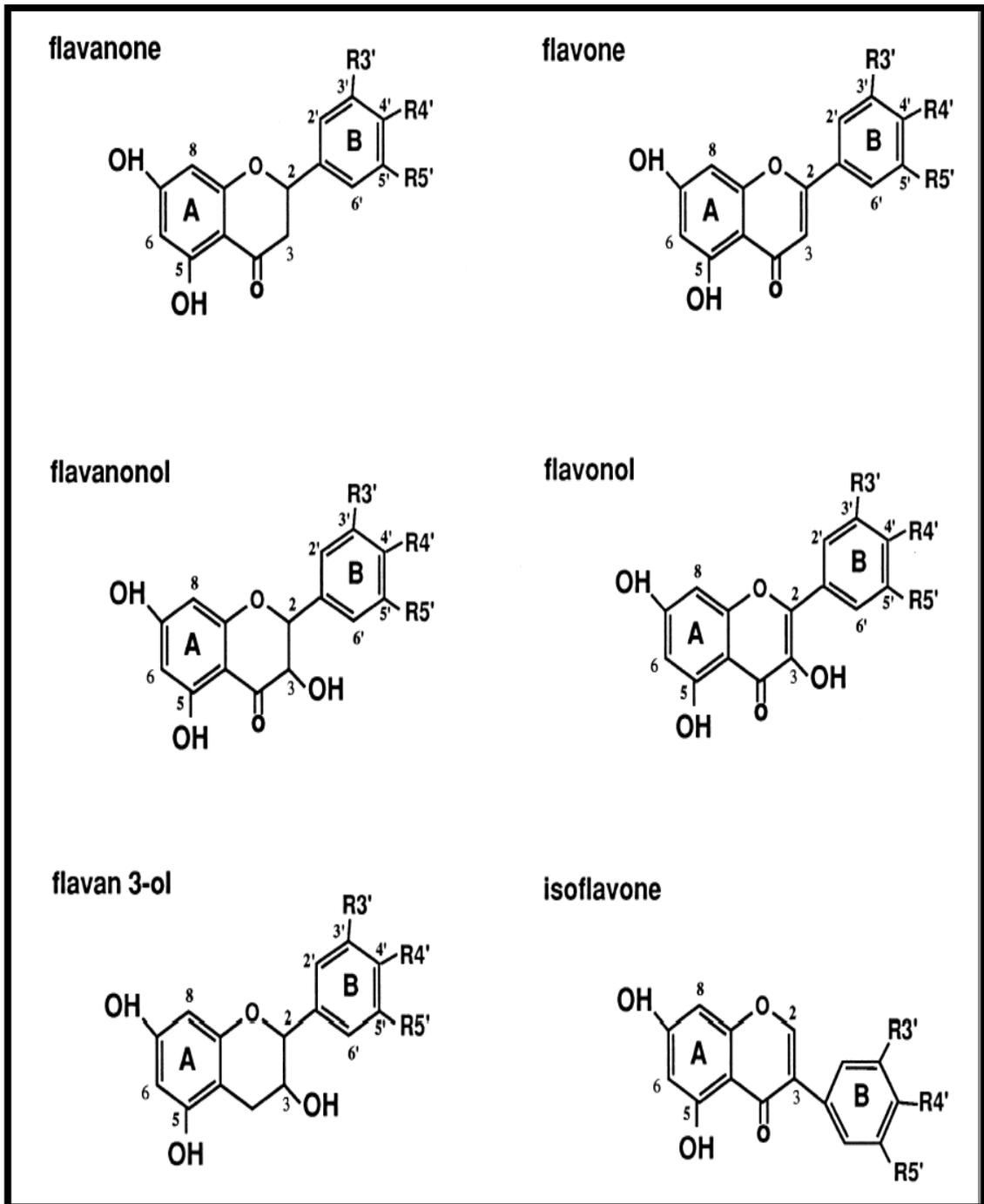
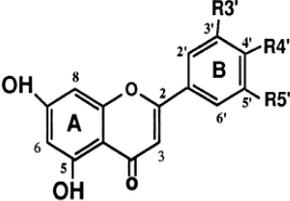
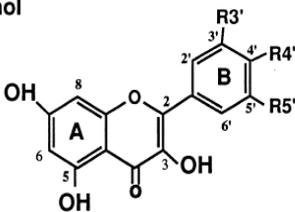
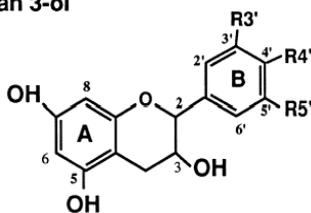
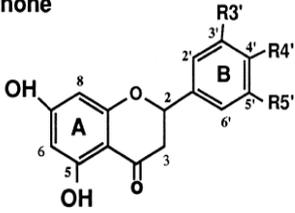
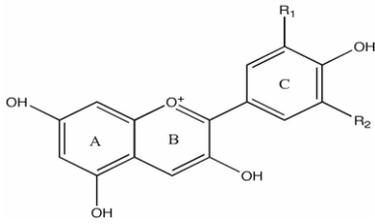
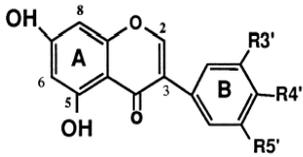


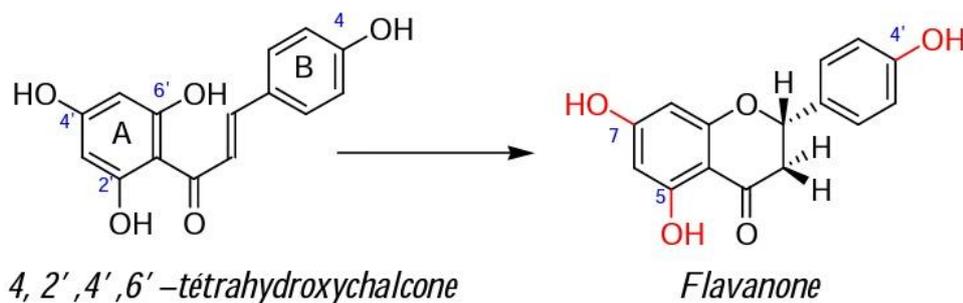
Figure04 : les diverses classes de flavonoïde

Tableau02 : principale classe des flavonoïdes

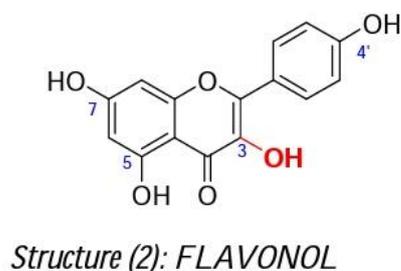
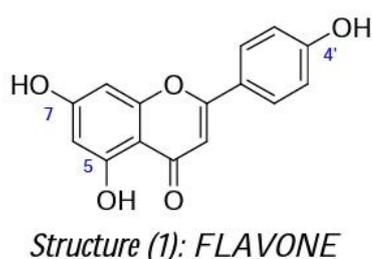
Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemple
flavones	flavone 	H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
flavonols	flavonol 	H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols	flavan 3-ol 	OH	OH	H	Catéchine
Flavanones	flavanone 	H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidin
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones	isoflavone 	H	OH	H	Genisteine

Flavones et flavonols

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6' -tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4', cela étant, l'un d'entre eux peut être absent .

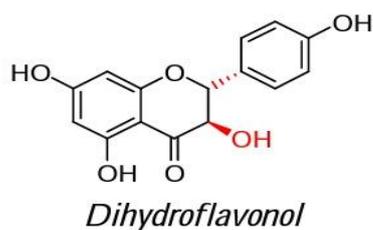
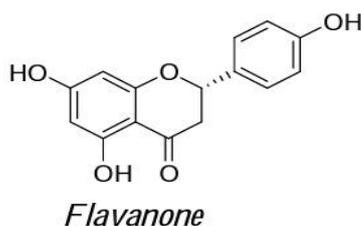


Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols [structures (1) et (2)] est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre. D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3', 4', 5' -trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. De plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3 [22].



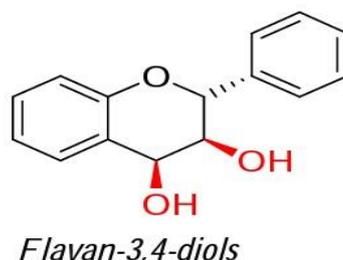
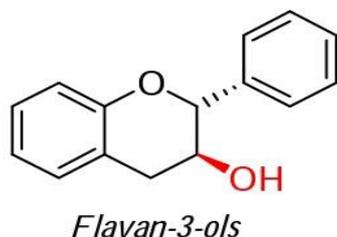
Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols [22].

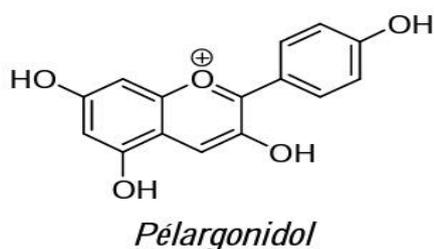


Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols).

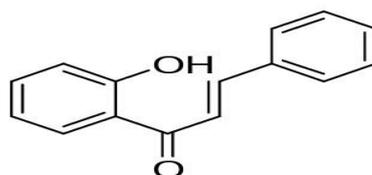


Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pèlargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine. Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés [20].



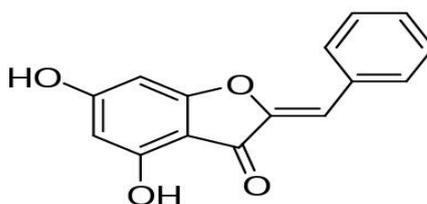
Chalcones et aurones

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.



Chalcone

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone.

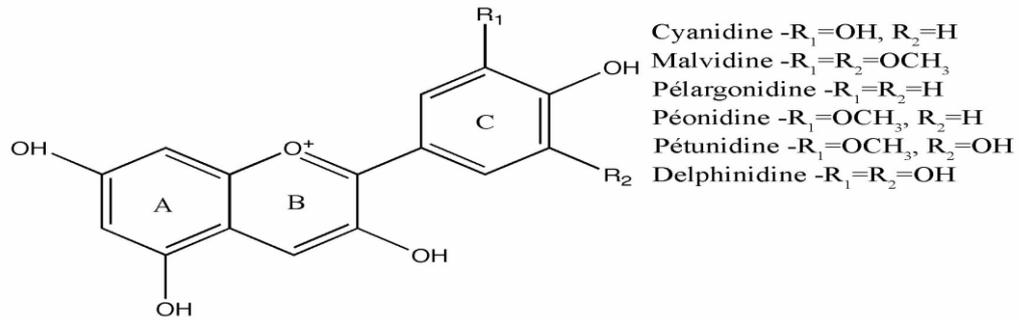


Aurone

Néanmoins, selon d'autres auteurs, la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols [23].

Les anthocyanes

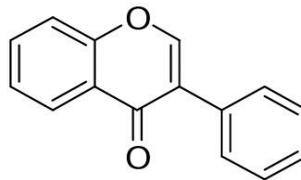
Les anthocyanes (anthocyanidines lorsque sous forme glycosylée) sont un groupe de molécules solubles dans l'eau, auquel on attribue la pigmentation rouge, bleu ou encore violet de plusieurs fruits tels que les aubergines, les pruneaux, les pommes et plusieurs types de baies [24]. Les proanthocyanidines diffèrent des autres composés phénoliques de par leur structure polymérisée qui, sous des conditions acides à température élevée, se retrouvent sous la forme d'anthocyanidines [25]. Jusqu'à maintenant, on a relevé plus de 300 différents anthocyanes et anthocyanidines d'origine végétale, dont les plus connus sont la cyanidine, la delphinidine, la pétunidine, la pélargonidine, la péonidine et la malvidine [26].



Isoflavone et neoflavone:

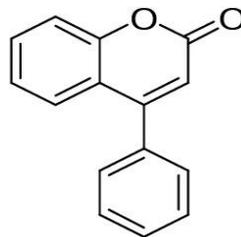
Les isoflavonoïdes sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses [27,28].

La structure des isoflavones ne diffère des autres flavonoïdes que par la présence du cycle B en position 3.



Isoflavone

Les neoflavones sont caractérisées par la substitution entre le groupement carboxyle et le noyau B dans le squelette des flavones [29].



Neoflavone

Les neoflavones sont des flavonoïdes rares, cette rareté est due à leur faible présence dans la nature contrairement aux flavones et flavonols.

I.5. La biosynthèse

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à

quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ [30] (Figure05)

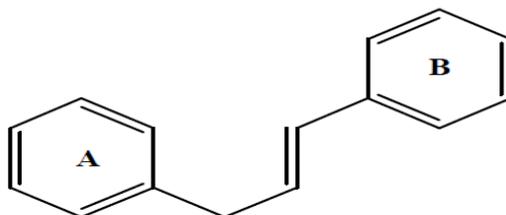


Figure05 : Squelette de base des flavonoïdes

Leur biosynthèse (Figure 06) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6' – tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3- hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2R, 3R)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside. Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides.

Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

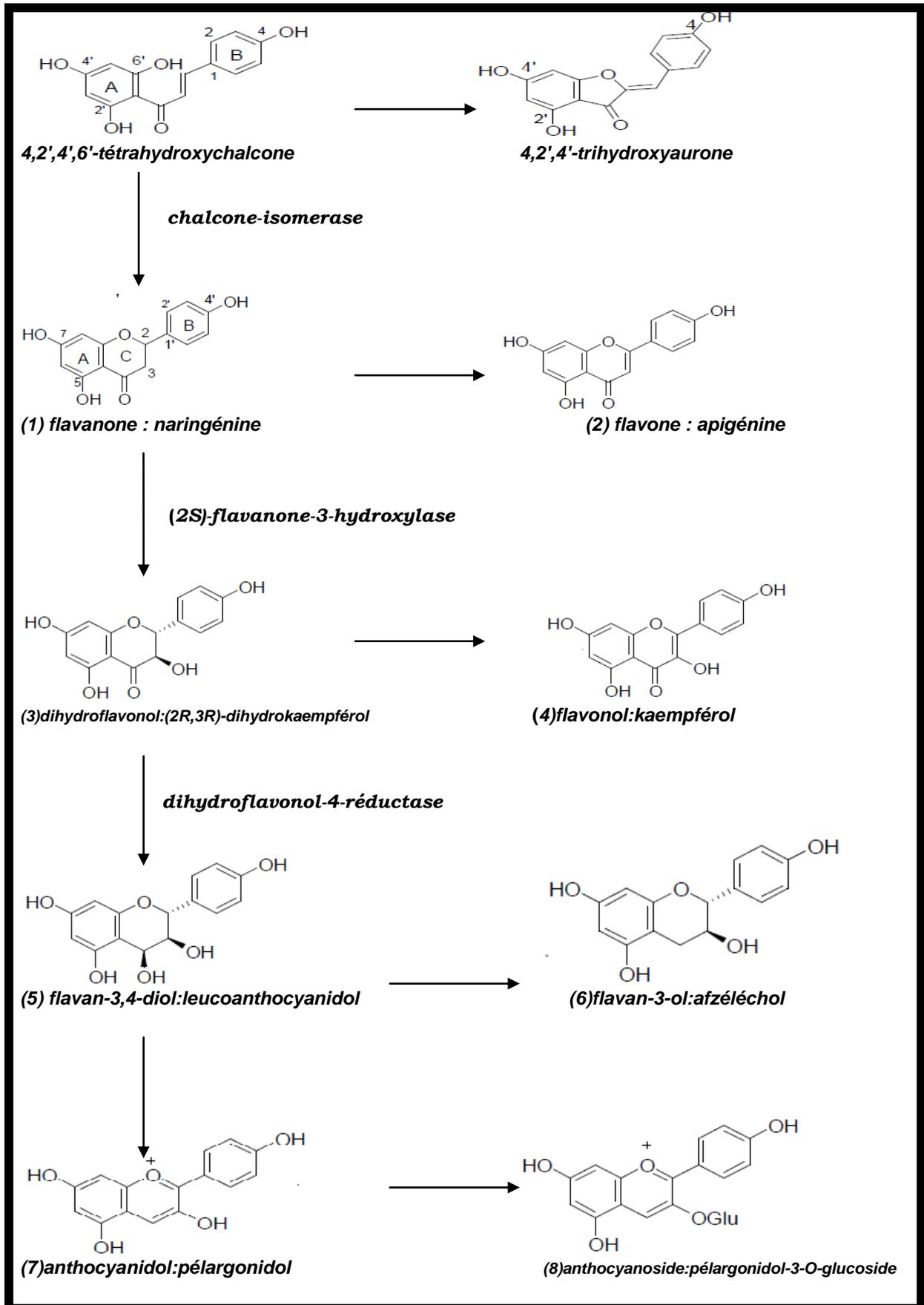


Figure 06 : La biosynthèse des flavonoïdes

II.6.Localisation

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants.

Les études sur la localisation tissulaire des flavonoïdes constituent un préalable fondamental à la compréhension des fonctions écologiques de ces composés. Le présent travail montre la localisation des flavonoïdes dans des parois cellulaires, des vacuoles et associés à des noyaux cellulaires, dans des feuilles de plantes monocotylédones et dicotylédones [31].

II.7.Distribution

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes, feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (tableau 03) [32].

Le Tableau03 : distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.

<i>Flavonoïdes</i>	<i>aliment</i>
<i>flavonols</i>	
Kaempférol	Radis, brocoli, thé noir
quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
Myricétine	Canneberge, vin rouge
Quercétine-3-glucoside	oignon
Quercétine-3-rhamnoglucoside (rutine)	Thé noir
<i>flavones</i>	
Chrysine	Peau des fruits
Apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
Lutéoline	Persil, céleri
Lutéoline-7-apiosylglucoside	Poivron rouge
<i>flavanones</i>	
Naringénine	Fruits des genres <i>citrus</i>

Hesperitine-7-rhamnoglucoside (hesperidine)	Jus d'orange
Naringenine-7-rhamnoglucoside (narirutine)	Jus d'orange
<i>Flavan-3-ols</i>	
Epicatéchine	Thé vert, thé noir
Catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
Epigallocatechine	Vin rouge
<i>Anthocyanidol</i>	
Cyanidol	Cassis, myrtille
Malvidol	Raisin, fraise, cassis
Apigénidol	Framboise, fraise
<i>isoflavones</i>	
Genisteine-7-glucoside	soja
Daidzeine-7-glucoside	

II.8. Propriétés des flavonoïdes

II.8.1. Propriétés Physico-Chimiques des flavonoïdes

II.8.1.1. Solubilité et l'extraction

Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les hétérosides peuvent être extraits, le plus souvent à chaud, par de l'acétone ou par des alcools additionnés d'eau. Il est possible de procéder ensuite à une évaporation sous vide et lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau, de mettre en oeuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau [30]. Si les aglycones sont les cibles, une hydrolyse chimique est habituellement effectuée avec de l'acide chlorhydrique ou l'acide formique à des températures élevées, l'hydrolyse enzymatique est également employée. Si l'intérêt des flavonoïdes-glycosylés intacts, l'hydrolyse devrait naturellement être empêchée [21].

II.8.1.2. Dosage

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques. L' HPLC offre maintenant la possibilité d'une estimation rapide et précise de tous les flavonoïdes[30].

II.8.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

II.8.2.1. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [33], et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) [34].

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles ce qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles. Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiésterases. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca²⁺ impliqué dans l'agrégation de ces cellules [35].

II.8.2.2. Propriétés des flavonoïdes contre le cancer

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments.

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du colon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la

quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG). [36,37].

II.8.2.3. Propriétés antivirale des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpes (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (A/WS/33) [38,39].

Certains chercheurs (Spedding et al. 1989) ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux.

D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral [39]. Ceci, impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

II.8.2.4. Propriétés cardioprotectrice des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Ces effets sont notamment les suivants :

- Inhibition de l'oxydation du cholestérol LDL (mauvais cholestérol) par les radicaux libres, étape initiale importante dans la formation de la plaque d'athérome.
- Abolition de la tendance des cellules sanguines de petite taille ou plaquettes à se regrouper et à former des caillots sanguins. Cet effet est souvent décrit comme « l'effet aspirine ».
- Régulation des réponses inflammatoires et immunitaires au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins qui peut être anormale en cas de maladie cardiovasculaire.

• Régulation du tonus vasculaire ou degré de constriction des petits vaisseaux sanguins qui contribue à l'hypertension [40,41].

II.8.2.5. Propriétés antioxydantes

Le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux [42]. Les radicaux libres sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons célibataires (le radical hydroxyle $OH\bullet$, l'anion superoxyde $O_2\bullet-$, l'oxyde nitrique $NO\bullet$...). Ils sont produits naturellement dans l'organisme :

- au niveau de la respiration mitochondriale lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O .
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- par diverses oxydases cellulaires ;
- au cours de la phagocytose.

De plus, les UV, la pollution, de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de radicaux libres. *Frenkel et Chrzan (1987)* ont montré que des promoteurs de tumeurs tels que le (TPA) peuvent également induire la formation de peroxyde d'hydrogène par des leucocytes humains et provoquer des coupures de l'ADN [43]. L'organisme possède ses propres mécanismes de défense permettant de lutter contre les radicaux libres ou les espèces oxygénées réactives, Il s'agit principalement d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase).

L'action protectrice de ces enzymes est complétée par celle de différents réducteurs présents dans les structures lipoprotéiques, (α -tocophérol, caroténoïdes, lycopène, ubiquinol) et dans le cytosol (acide ascorbique, glutathion réduit). De plus, certaines protéases semblent avoir pour rôle de reconnaître et de dégrader spécifiquement les protéines oxydées empêchant ainsi l'accumulation de protéines altérées et endommagées dans la cellule [44]. De plus, de nombreuses protéines ont un rôle antioxydant puisqu'elles vont pouvoir capter, stocker et transporter des métaux de transition (albumine qui piège le cuivre, ferritine qui stocke le fer) en séquestrant ainsi ces métaux, ces protéines préviendront par exemple la formation de radical $OH\bullet$ par la réaction de Fenton :



Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité des systèmes de défense, ces radicaux libres n'auront pas d'effets néfastes majeurs. Toutefois, si des quantités

importantes de radicaux sont générées, dépassant les possibilités de protection enzymatique et épuisant le pool de divers capteurs, alors, ces radicaux libres vont engendrer :

- des peroxydations lipidiques favorisant l'athérosclérose et le vieillissement,
- des modifications oxydatives des protéines les rendant inactives,
- des dommages oxydatifs de l'ADN et de l'ARN aboutissant à des mutations et à la cancérisation.

L'intérêt métabolique des antioxydants alimentaires fait, à l'heure actuelle, l'objet d'un grand nombre de travaux. Parmi ces antioxydants, de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant des polyphénols [45].

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées [43]. En fait, leur activité antiradicalaire nécessite:

- ❖ La structure ortho-diphénolique du cycle B, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- ❖ La double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo-, qui est responsable de la délocalisation d'électrons stabilisant le radical aroxy.
- ❖ Les hydroxyles en positions 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale.

II.8.2.6. Propriétés antibactériennes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [47].

II.8.2.7. Propriétés antiallergiques

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique

phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺ dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme[48].

II.8.2.8.D'autres effets biologiques

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [49]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques[50].

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [51].

II.9. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés bénéfiques biologiques et antioxydants. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif.

Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus. Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du côlon. Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale [52].

II.10. L'intérêt des flavonoïdes

1-Le rôle physiologique des flavonoïdes

- Les flavonoïdes sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection, du tissu contre les effets nocifs du rayonnements UV.

- Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones.

- D'autres flavonoïdes incolores tels que les flavonones et les flavonols interagissent avec les anthocyanes pour altérer, par copigmentation la couleur des fleurs et des fruits.

- Induction des gènes NOD: Chez les légumineuses, les flavonoïdes sont des composés indispensables à l'établissement de la symbiose entre les bactéries de type *Rhizobium* et leurs plantes hôtes. Un certain nombre de flavonoïdes qui peuvent être présents dans les racines ou dans les exsudats racinaires vont activer directement les protéines régulatrices NOD de la bactérie en la fixant sur la bactérie.

- Développement, germination et croissance du tube pollinique: des études ont montré que les flavonoïdes jouent un rôle dans la production sexuée, ils s'accumulent dans les anthères et les pistils.

Certains flavonols sont capables de stimuler *in vitro* la germination du pollen et la croissance du tube pollinique.

2-Biologique

Parmi les agents qu'ont des activités antimicrobiennes, les flavonoïdes dont les études ont prouvé ces actions:

- Il a été montré que les composés flavoniques, les moins polaires, c-à-d les moins substitués par des groupements hydroxyles sur le noyau B sont les plus actifs vis-à-vis, les micro-organismes. Cela est renforcé par la découverte que la méthylation des flavonoïdes augmente l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*.

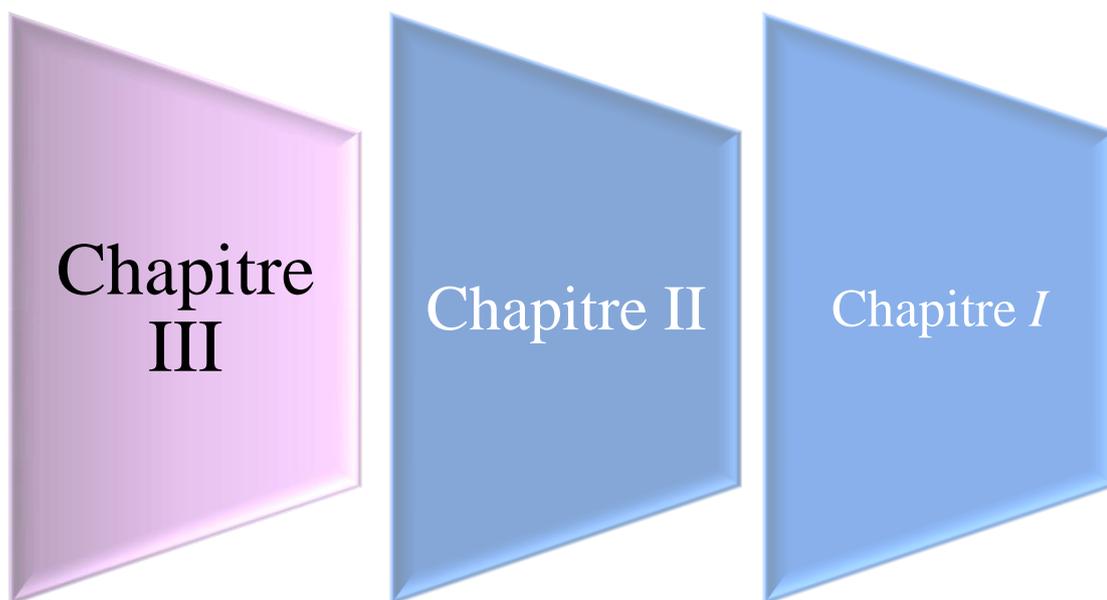
- Ainsi il a été montré avec les bactéries *Actionomyces viscosus*, *Staphylococcus* que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux A et B essentiellement (5-OH), en plus une substitution aliphatique sur le noyau A détermine l'activité antibactérienne des flavones.

- Les dérivés glucosyles de la quercétine et de la quercétagine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les micro-organismes pathogènes.

- La présence des groupements hydroxyles libres dans les positions 3,3', et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *Proteus vulgaris*.

3-Importance des flavonoïdes dans les interactions insectes – plantes: alimentation et ponte

Jeffrey Harborne et ses collègues ont été chargés de rassembler la majorité des données sur le rôle des flavonoïdes dans les interactions insectes-plantes. Il est clair que les insectes peuvent discriminer les flavonoïdes et que ces composés peuvent moduler le comportement alimentaire et de ponte des insectes, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes neuronaux associés à ces réponses comportementales. Malgré la richesse des données sur la diversité des flavonoïdes dans les plantes, très peu de ces composés ont été testés contre les insectes et leur rôle dans l'évolution de la gamme d'hôtes dans les interactions insecte-plante n'a pas encore été déterminé[50].



Etude phytochimique et pharmacologique



III.1. Extraction, isolement, purification et analyses structurales des flavonoïdes

III.1.A. partie théorique

III.1.A.1. Extraction des flavonoïdes

III. 1.A.1.1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant.

L'extraction est une étape nécessaire et présente dans de nombreux procédés de fabrication dans les différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire [54].

III.1.A.1.1.1.principe

L'extraction solide-liquide (SLE) est l'une des techniques les plus utilisées dans l'industrie des plantes médicinales et aromatiques. Elle repose sur le passage des principes actifs, présents dans la matière végétale, dans un solvant liquide par diffusion et dissolution (**Schéma01**).

La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide

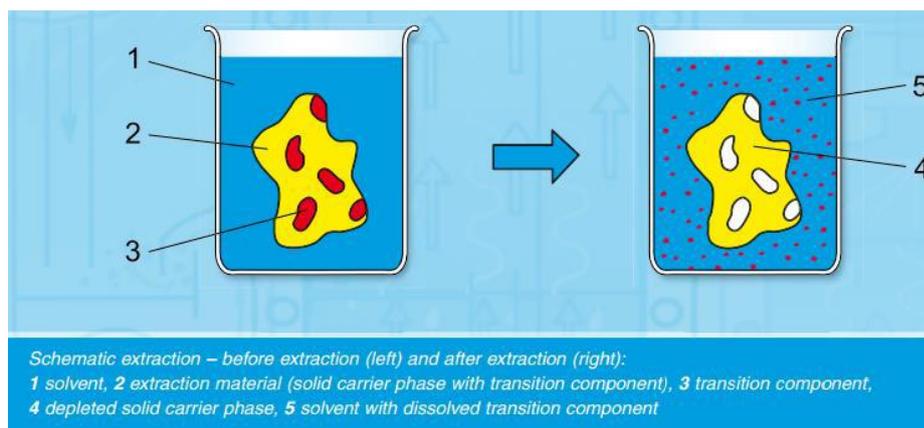


Schéma01 : Schéma de l'extraction avant et après la macération.

III. 1.A.1.1.2. Extraction par macération

La poudre de la plante médicinale est macérée à température ambiante pendant quelques heures à une nuit dans des solutions aqueuses des solvants : éthanol, acétone, méthanol [55].

III. 1.A.1.1.3. Filtration

La filtration est une méthode mécanique utilisée pour séparer un solide d'un liquide ou d'un gaz en faisant passer le mélange par une membrane ou un chiffon fin, par l'aide d'un entonnoir.

La filtration est une séparation selon le diamètre des particules solides de différentes tailles, qui sont dispersées dans un liquide. La différence de pression force le liquide à passer à travers le filtre alors que les particules solides restent à la surface.

III. 1.A.1.1.4. Filtration sous vide

La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant (**Figure 07**). C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs spéciaux adaptés sur une fiole à succion, dans laquelle on crée une dépression, sont utilisés. L'entonnoir est adapté sur la fiole par l'intermédiaire d'un cône en caoutchouc, qui collera à la fiole et l'entonnoir lorsque la dépression est établie.

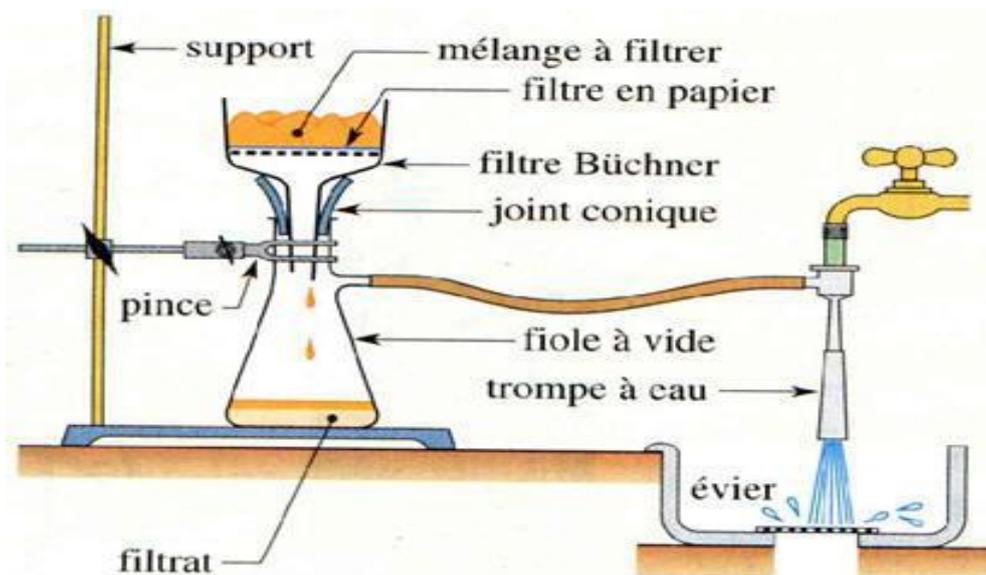


Figure 07 : montage de filtration sous vide.

III. 1.A.1.2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée à l'échelle industrielle, dans des domaines aussi variés que l'hydrométabolisme classique, l'industrie nucléaire, la pétrochimie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'industrie agroalimentaire. Bien que le principe de cette technique soit relativement simple, les séparations qu'elle permet de réaliser sont en réalité le résultat de la conjonction d'un grand nombre de phénomènes physico-chimiques [56].

III. 1.A.1.2.1.Principe

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non-miscibles.

Généralement on met en contact intime la solution d'alimentation, contenant les constituants à séparer (solutés) avec un autre solvant appelé solvant qui extrait préférentiellement un ou plusieurs des solutés. Le solvant qui contient alors le ou les solutés est désigné sous le terme : d'extrait, la solution d'alimentation ayant perdu la majeure partie de ces mêmes constituants est appelé raffinat.

En pratique l'utilisation d'un procédé liquide-liquide requiert deux opérations successives :

- Une mise en contact intime des deux liquides durant un temps suffisant à l'obtention de l'équilibre pendant lequel le ou les solutés sont transférés de la phase d'alimentation dans le solvant ; à l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat , appelé coefficient de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour les deux phases.
- Après leur contact, une séparation ultérieure des deux liquides (extrait et raffinat).

Même si le principe de l'extraction liquide-liquide paraît simple, sa mise en place est assez complexe. Comme nous allons le voir, il faut successivement choisir le soluté, le système liquide-liquide, le procédé et enfin l'appareil qui donneront les meilleures performances.

III. 1.A.1.2.2. La décantation

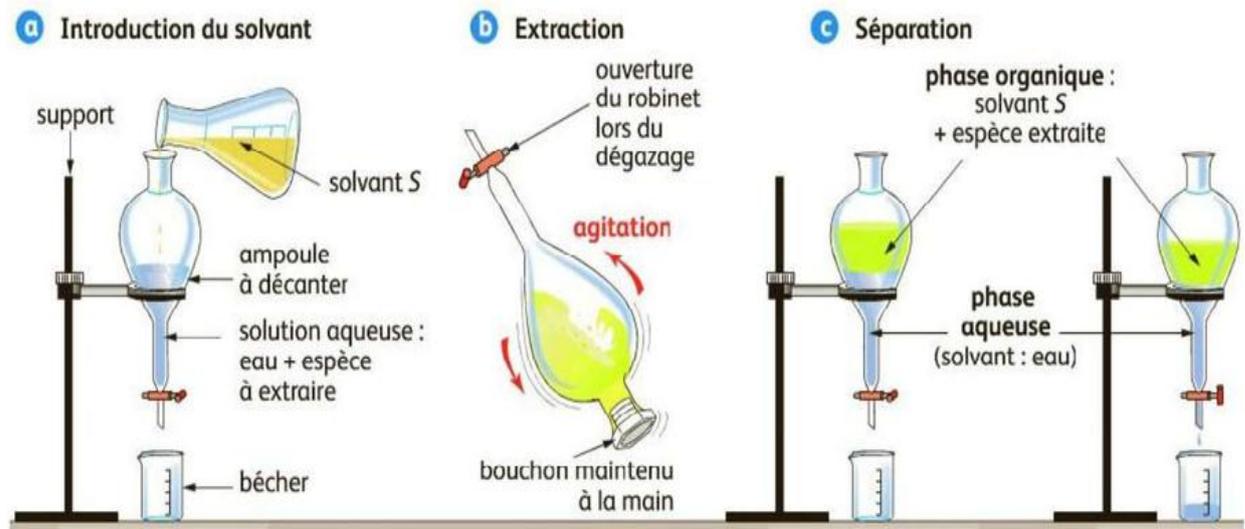
La décantation est une opération de séparation mécanique, par différence de gravité de phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide. On peut séparer des phases liquides, une phase solide en suspension dans une phase liquide...

la décantation consiste à séparer 2 liquides non miscibles (qui ne se mélangent pas) entre eux.

Le liquide le moins dense (a) reste en surface.

Le liquide le plus dense (b) se retrouve en bas.

Il pourra être retiré par le bas en ouvrant le bouchon (appel d'air) .



❖ Les différentes étapes

❖ Où se trouvent les phases aqueuse et organique ?

Deux possibilités :

On connaît la densité du solvant organique utilisé.

On peut facilement en déduire quelle est la phase organique et quelle est la phase aqueuse.

La phase de densité supérieure constitue la phase inférieure.

Dans le cas contraire il faut réaliser le test à la goutte d'eau. Si la goutte d'eau semble « tomber » dans la phase supérieure, cette phase ne présente aucune affinité pour l'eau. C'est donc la phase organique [57].

III. 1.A.1.3. L'évaporation des extraits

III. 1.A.1.3.1. Principe de l'évaporateur rotatif

L'évaporateur rotatif (ou rotavap, ou rotavapor) est un appareil utilisé en chimie afin de distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer partiellement une solution ou pour concentrer à sec (on enlève tout le solvant) une solution ou une suspension.

Cet appareil permet d'éliminer rapidement un solvant volatil par évaporation. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition avec la pression (schéma 02).

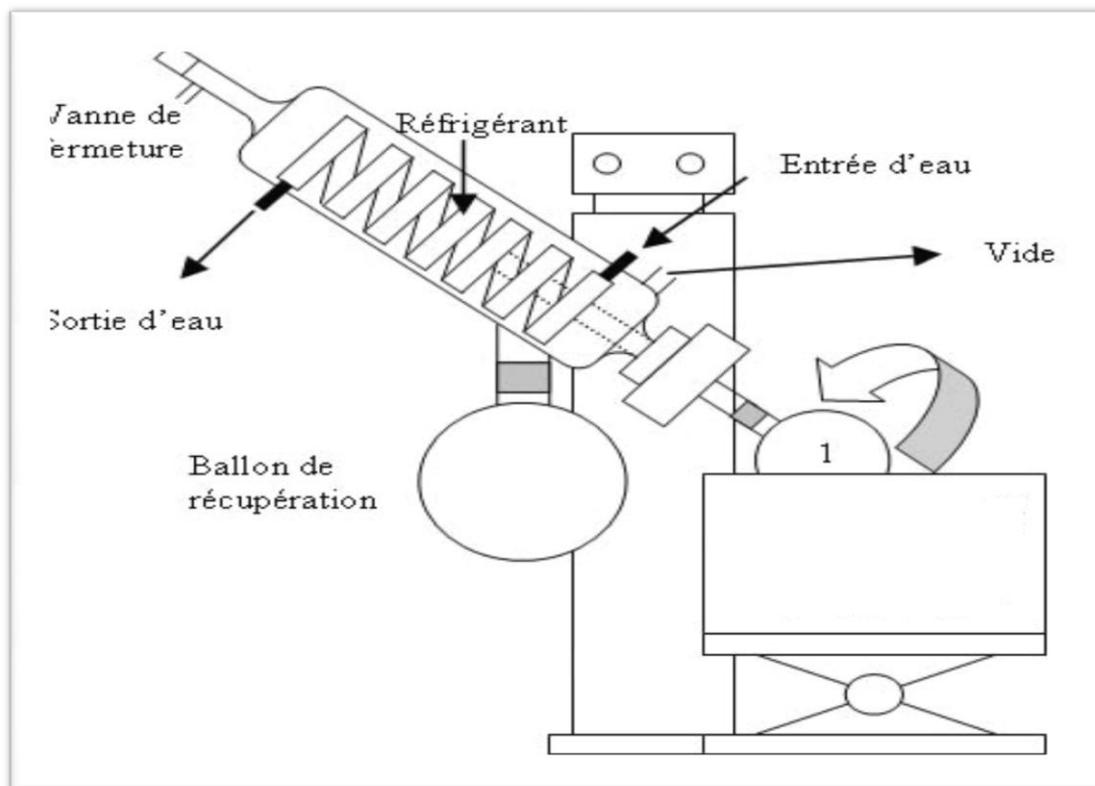


Schéma02 : schéma de l'évaporateur rotatif .

Placer la solution contenant le solvant à évaporer dans le ballon 1 et le mettre ensuite sous rotation. Ouvrir le robinet d'eau froide relié au réfrigérant. Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau.

Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon 1 dans le bain marie d'eau chaude. Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant.

Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif. Couper l'eau du réfrigérant et de la trompe à eau.

III.1.A.2. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de

composés colorés puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphe in signifie écrire[55].

III. 1.A.2.1. Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

III. 1.A.2.2 Appareillage

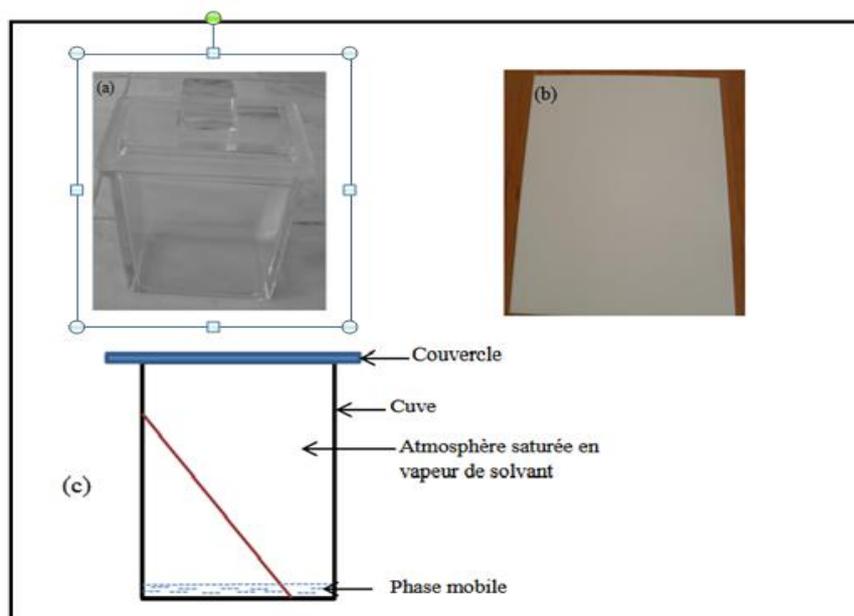
La cuve chromatographique: un récipient habituellement en verre de forme variable; fermé par un couvercle étanche.

La phase stationnaire: une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique.

L'échantillon: environ 1 μ l de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant.

L'éluant: un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

La figure représente les principaux éléments d'une séparation CCM.



La figure 8 : les principaux éléments d'une séparation CCM.

(a) Cuve chromatographique ; (b) plaque CCM ; (c) schéma d'un montage CCM.

III.1.A.2. 3. Autres méthodes chromatographie

III. 1.A.2. 3.1. Chromatographie sur colonne

Chromatographie sur colonne (C. C) Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la C.C peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes [59].

III. 1.A.2. 3.2. La chromatographie sur papier Wattman

Cette technique de séparation repose sur le phénomène de partage des constituants d'un extrait entre la phase stationnaire et la phase mobile. Elle utilise une phase stationnaire constituée par l'eau elle-même absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. La phase mobile est le plus souvent un mélange très polaire de solvants organiques et de l'eau, qui entraîne les molécules séparées avec des vitesses différentes, selon leur degré d'affinité vis-à-vis des deux phases. Elle est généralement appliquée pour la séparation et parfois la purification des produits en faible quantité, soit en mode monodimensionnel ou bidimensionnel [60].

III. 1.A.3. Caractéristiques spectrophotométrique

III. 1.A.3.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les végétaux flavonoïdes pigments chromophores capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fonctions chimiques responsables de cette absorption sont constituées de liaisons riches en électrons délocalisés ou de la conjugaison de celles-ci. L'étude de ces propriétés chromatiques se fait par le biais de la spectrophotométrie UV-visible. Cette méthode physique simple et rapide très utilisée dans la détermination du squelette flavonique, ainsi que la position des substituant. L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV dans le méthanol et en présence de réactifs s'appuie sur les données de la littérature décrites par Mabry *et al.* (1970), Markham (1982) et Voirin (1983). En effet, le spectre d'absorption d'une structure flavonique présente deux bandes d'absorptions essentielles (**figure 9**) :

- La bande I située à entre 300 et 400 caractérise la forme cinnamoyle de la molécule.
- La bande II située à 240-285 nm est attribuée à sa forme benzoyle.

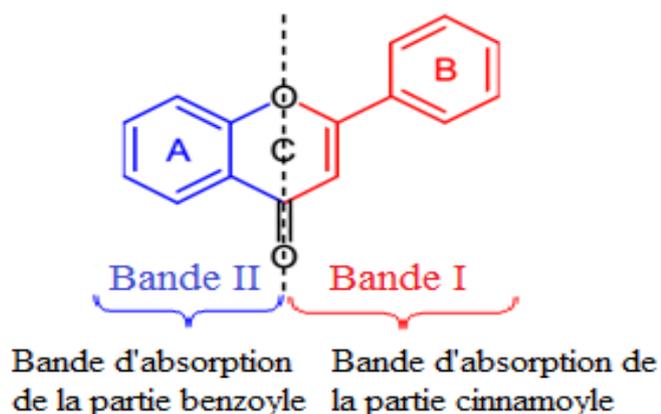


Figure 9 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

L'augmentation du nombre d'hydroxyle sur le noyau B se traduit par un effet bathochrome de la bande I ; il en est de même pour la bande I en relation avec le noyau A. De plus, la bande II apparaît sous forme d'un pic unique ou un pic accompagné d'un épaulement, selon que le noyau B est hydroxylé en position 3' ou dihydroxylé en position 3' et 4'. L'emploi de réactifs 13 tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique; permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonique[61]

Tableau 04 : Principales caractéristiques des spectres UV-Visible des flavonoïdes

Bande II	Bande I	Types de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols substitués en C3
250-280	350-385	Flavonols
245-275	310-330 (épaulement pic à 320)	Isoflavones Isoflavones (5-desoxy-6,7-dioxygénés)
275-295	300-330Epaulement	Flavanones et Dihydroflavonols
230-270 (Faible intensité)	340-390	Chalcones
230-270	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes

Tableau 5 : Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs

Réactifs	Déplacements en nm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavones
	330-360	250-280	Flavonols(3-OH substitué)
	350-380	250-280	Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+45 à 65 BI avec stabilité d'intensité		4'OH
	+50 à 60 avec diminution d'intensité		3',4'-di OH
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4' -OMe
	Absence de pic entre 320-335		7-OR
	Apparition d'un pic entre BI et BII		7-OH
	Transformation de BI en une inflexion		5-OH
AlCl ₃ + MeOH	+20 à 45		5-OH
	+60		3-OH
AlCl ₃ + HCl / AlCl ₃	-30 à 45		3',4' -di OH
	-10		3',4'-OH,OMe
	-20		3',4',5'-tri OH
AlCl ₃ +HCl / MeOH	+35 à 55		5-OH
	+17 à 20		5-OH
NaOAc / MeOH	+20 à 80		7-OH
	Déplacement très faible		7-OR
	Diminution d'intensité avec le temps		6,7 ; 7,8 ou 3',4'-di-OH
	Spectre se décompose avec le temps		5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3,3',4'-tri OH
NaOAc + H ₃ BO ₃ / MeOH	+12 à 36		3',4'-di OH
	+5 à 10		6,7 ou 7,8 – di OH

III. 1.A.3.2. Spectrométrie de masse

Cette technique est utilisée pour confirmer mais aussi pour finaliser (pas toujours) l'ébauche structurale obtenue grâce aux données des Rf et des données de l'UV-Visible. Parmi les informations d'ordre structural qu'on peut y tirer, on citera :

- La détermination du pic moléculaire qui permet d'apprécier globalement le nombre et la nature des substituant hydroxyles ou méthoxyles; cette détermination dans le cas complexes peut être effectuée à haute résolution permettant ainsi d'accéder avec une extrême précision à la formule brute de la molécule étudiée.
- La détermination des pics de fragmentation qui vont fournir des indications sur la répartition des substitutions entre les noyaux A et B.
- La détermination de la nature et le site d'attachement des sucres dans les "O" ou "C" glycosides[62].

III. 1.A.3.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques plutôt compliquées . C'est une méthode précise et efficace, mais exige une grande quantité de produit ; Simplement, à l'inverse des autres techniques, elle est non destructive.

Il existe la RMN monodimensionnelle et la RMN bidimensionnelle :

RMN monodimensionnelle

RMN du proton (RMN 1H)

Elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm; elle permet de connaître [62,63].

- La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde.
- Le nombre de substituant méthoxyles porté par le squelette flavonique.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

RMN carbone -13

Donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [62] :

- Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.

- La connaissance de type des liaisons –C et / ou –O- sucres.

RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [64].

III. 1.A.3.4. Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge sont enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker IFS55. Tous les échantillons liquides ont été analysés sous forme de film de produit pur entre deux plaques de NaCl ou sur une pastille de Zinc-Sélénium (neat). Les échantillons solides sont soit dissous dans du dichlorométhane et analysés sous forme de film par évaporation du solvant, soit broyés et mélangés avec du KBr et analysés sous forme de pastille. Toutes les valeurs de fréquence sont exprimées en cm^{-1} . Seules les bandes caractéristiques sont décrites.

III.1.B Partie expérimentale

III.1.B.1. Extraction solide-liquide

300g de matière végétal broyé est soumis à une extraction par macération dans le mélange (éthanol / eau) (70/30: v/v) pendant 24 heures à température ambiante. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur Büchner. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif à une température de 45 °C. Le résidu obtenu est de nouveau mis à une deuxième macération pendant 24 heures avec la quantité d'éthanol récupéré. L'extrait obtenu après filtration est concentré à sec sous pression réduite pour éliminer l'éthanol.



Figure10: macération de la matière végétale



Figure 11: filtration de la matière végétale



Figure12 : extrait hydro-alcoolique



Figure13 : évaporation du filtrat

Le protocole général de cette opération est schématisé ci-dessous (**schéma 03**).

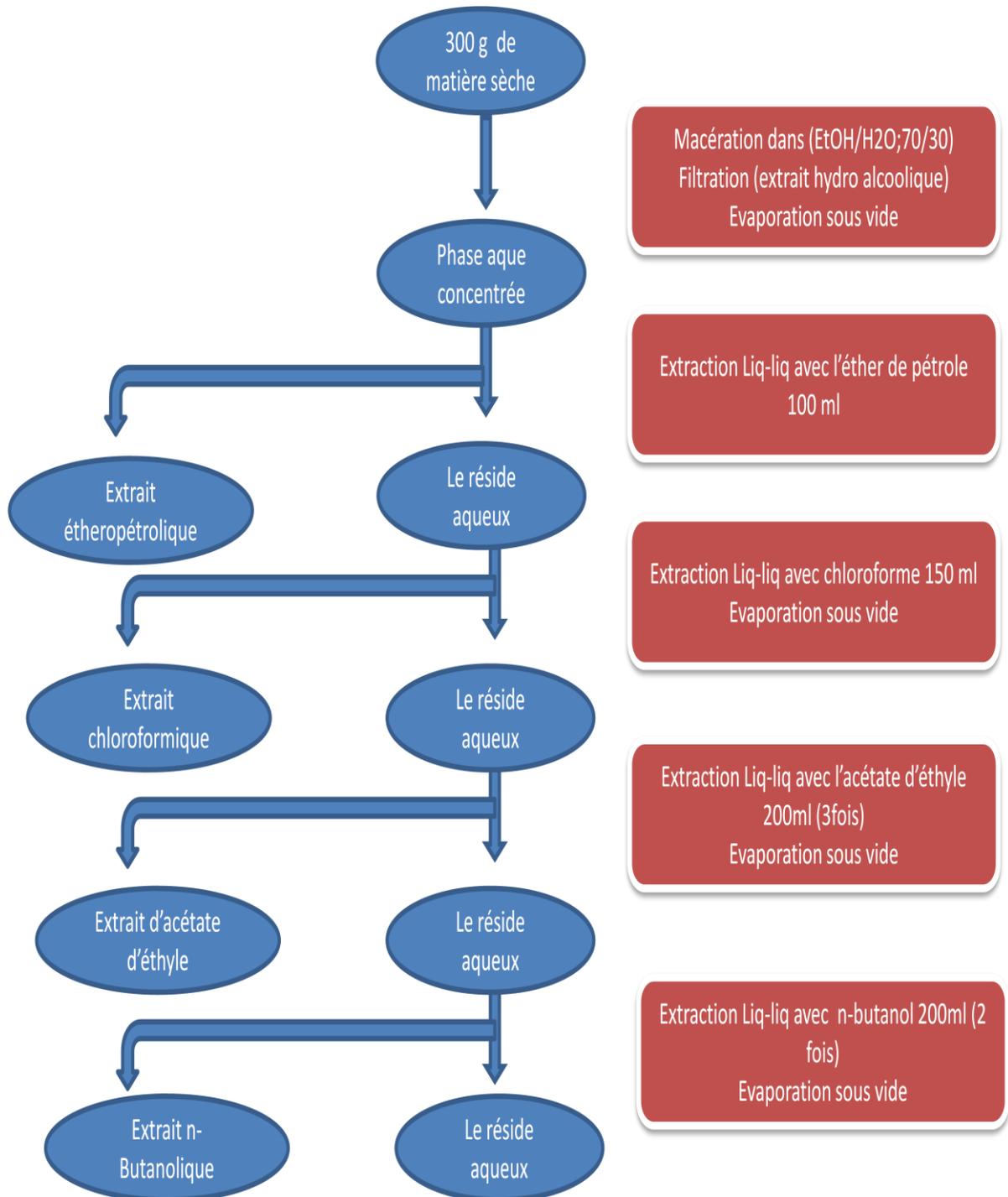


Schéma 3 : schéma générale de protocole de l'extraction.

III.1.B.2.Extraction liquide-liquide

Dans cette étape l'extrait obtenu est soumis à une extraction liquide-liquide, on procède la décantation par ordre de polarité croissante des solvants :

- ✓ Affrontement par éther de pétrole
- ✓ Affrontement par chloroforme
- ✓ Affrontement par acétate d'éthyle
- ✓ Affrontement par n-butanol

Tableau 6 : Certaines propriétés physiques et chimiques des solvants utilisées dans la décantation .

Le solvant	Formule brut	Point d'ébullition en C°	La densité en g /cm ³
éther de pétrole	CH ₃ -(CH ₂) _N -CH ₃	60	0.65
chloroforme	CHCl ₃	61	1.49
par acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂ ,	77	0.90
n-butanol	C ₄ H ₉ OH	177	0.80

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés à la repose pendant 30 minutes, la phase aqueuse et la phase organique (qui est chargée de molécules spécifiques) sont récupérées séparément. Les différentes phases récupérées sont évaporées à sec sous vide à 50°C ; puis sont séchées à l'air libre et les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

III.1.B.2.1. Extraction par l'éther de pétrole

L'éther de pétrole est un composé de la famille des essences hydrocarbures, sa formule générique : CH₃-(CH₂)_N-CH₃, encore appelée « essence » est un solvant apolaire aprotique, il permet d'éliminer la chlorophylle et les lipides.

On introduit 150 ml d'éther de pétrole dans l'ampoule à décanter contenant la phase aqueuse, après l'agitation et la décantation des deux phases avec répétition pratique de deux fois ,on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (d'éther de pétrole) de couleur vert mais elle est éliminée car elle ne contient que des matières grasses, des chlorophylles et des impuretés. (**figure 14**)

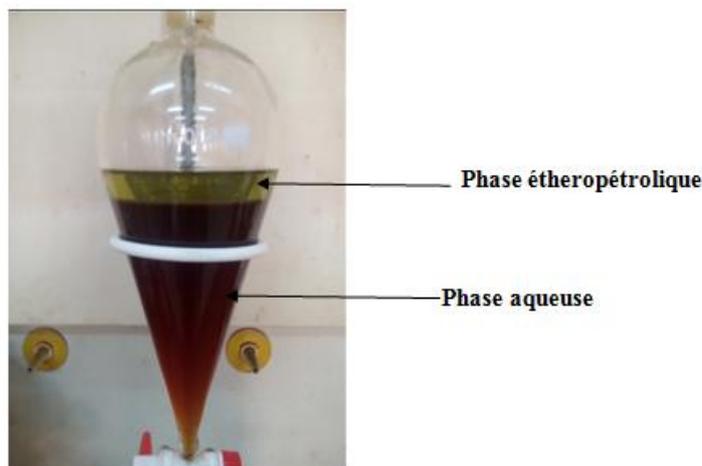


Figure 14: l'extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole.

III.1.B.2.2. Extraction par le chloroforme

Le chloroforme est un composé organique de formule CHCl_3 , est un solvant de polarité moyenne, ce liquide incolore, dense et de goût sucré. Après traitement à l'éther de pétrole pour éliminer les graisses et les cires, la phase aqueuse est extraite au chloroforme.

On ajoute 200 ml de chloroforme à la phase aqueuse, après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un ballon la phase organique inférieure (de chloroforme) de couleur jaune clair (**figure 15**).

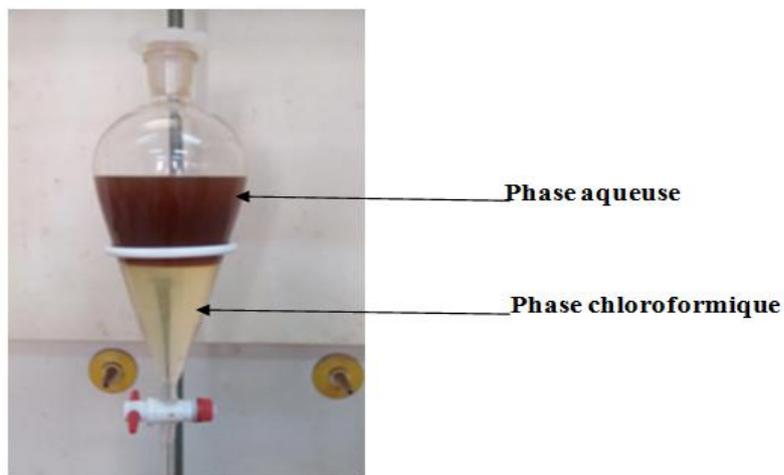


Figure 15 : l'extraction liquide-liquide avec le chloroforme.

III.1.B.2.3. Extraction par l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est un liquide, de formule $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, à l'odeur caractéristique fruitée. C'est un ester résultant de l'éthanol et de l'acide acétique utilisé principalement comme solvant.

on ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle à la phase aqueuse traitée par le chloroforme et contenue dans l'ampoule à décanter, après l'agitation et décantation des deux phases avec répétition pratique de trois fois pour avoir les flavonoïdes polaires (flavonoïde aglycones et mono-glycosides), on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (d'acétate d'éthyle) de couleur jaune (**figure16**).

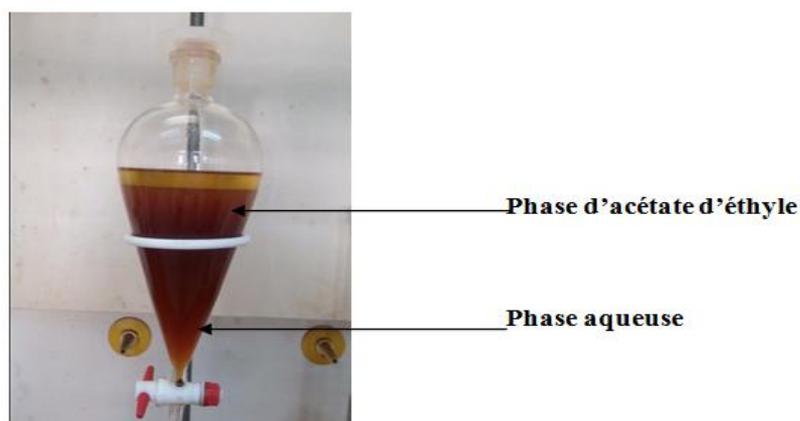


Figure 16 : l'extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle

III.1.B.2.4. Extraction par n-butanol

Le n-butanol ou l'alcool n-butylique ou le butanol normal est un alcool primaire de formule chimique C_4H_9OH .

On ajoute 200 ml de n-butanol à la phase aqueuse traité par l'acétate d'éthyle et contenue dans l'ampoule à décanter, après des deux phases avec répétition pratique de trois fois pour avoir les flavonoïdes plus polaires (flavonoïdes di glycosides), on récupère dans un ballon la phase organique supérieure (de n-butanol) avec une couleur marron clair. (**figure 17**).

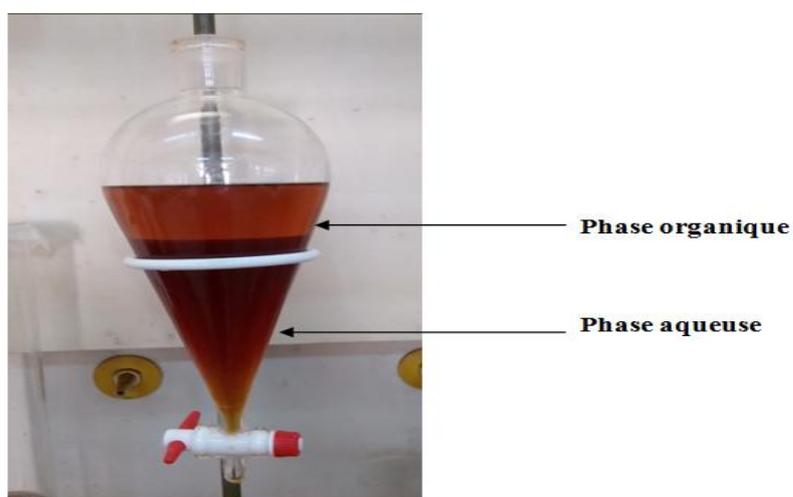


Figure 17 : l'extraction liquide-liquide avec le n-butanol.

III.1.B.3. L'évaporation des extraits

On passe à l'évaporation des extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) (**figure18, 19,20**) pour éliminer les solvants organiques. L'évaporation des extraits précédents a été faite à l'aide d'une évaporation rotative.



Figure 18 : l'extrait de chloroforme (en couleur jaune clair)

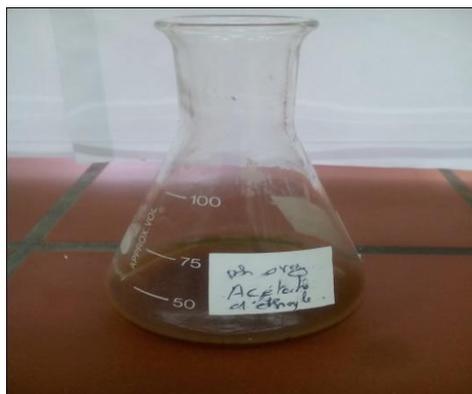


Figure 19 : l'extrait d'acétate d'éthyle (en couleur vert clair)

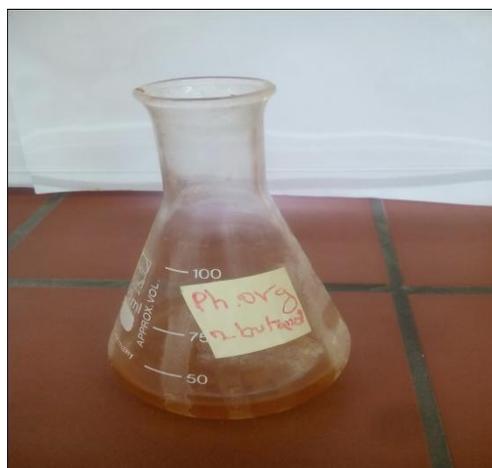


Figure 20 : l'extrait de n-butanol (en couleur jaune foncé)

III.1.B. 4. Chromatographie sur couche mince CCM

Les deux extraits obtenus (acétate d'éthyle et n-butanol) ont été analysés par chromatographie sur couche mince CCM, cette analyse a été effectuée avec des plaques de gel de silice à l'emploi (0.25 mm d'épaisseur), sur support semi-rigide en aluminium.

1- Préparation de la cuve chromatographique

- remplir la cuve chromatographique du mélange de solvants (hauteur \cong 0,5 cm).

Les systèmes d'élution utilisés pour l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 7: système d'élution pour l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol

Extrait d'acétate d'éthyle / Extrait de n-butanol	
Eluant	Volume (ml)
Sys1 : Toluène/Ethanol/Méthyle	(4/3/3)
éthyle cétone (butanone)	
Sys2 : H ₂ O /Méthanol/ Méthyle	(0.1 /1/7)
éthyle cétone	
Sys 3 : H ₂ O / Ethanol/Butanol/Acide acétique	(0.1 /1/1.5/3)

- la recouvrir, afin que l'atmosphère dans la cuve reste saturée en vapeurs d'éluant.

2- Dépôt de l'échantillon sur la plaque

- sur la plaque chromatographique, tracer au crayon de papier un trait horizontal à 1 cm environ du bord inférieur. Ce trait ne doit pas tremper dans le solvant d'élution contenu dans la cuve.

- déposer sur le trait, à l'aide de cure-dents, à 0,5 cm d'intervalle, une microgoutte de :

° extrait d'acétate d'éthyle.

° extrait de n-butanol.

- laisser sécher les taches à l'aide d'un sèche-cheveux.

3 - développement de la chromatographie

- déposer la plaque verticalement dans la cuve et la couvrir.

- lorsque le solvant a atteint les $\frac{3}{4}$ environ de la hauteur de la plaque (1 cm du bord supérieur), sortir la plaque de la cuve.

- les plaques ont été observées sous lampe UV-visible 254 nm et 360 nm.

- les taches de couleur sont entourées d'un crayon pour calculer Rf.

Les composés de l'échantillon sont illustrés sur les chromatogrammes suivants :

- Analyse d'extrait d'acétate d'éthyle

Chromatogramme 1 :

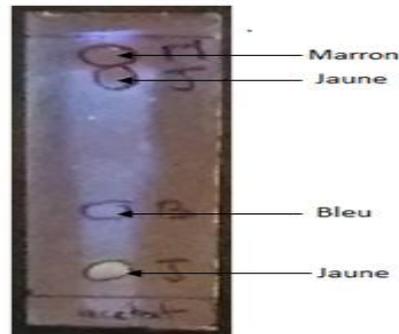


Figure 21 :sys1 : Toluène/Ethanol/Méthyle Ethyle cétone (4/3/3) pour l'extrait d'acétate d'éthyle

Chromatogramme 2 :

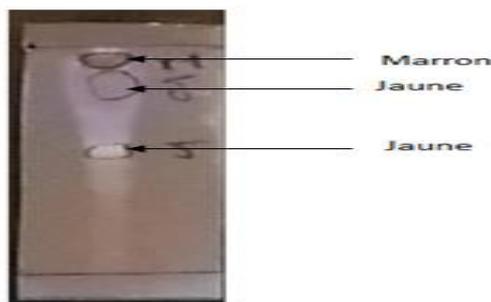


Figure 22 : sys2 :H₂O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone (0.1 /1/7) pour l'extrait d'acétate d'éthyle

Chromatogramme 3 :

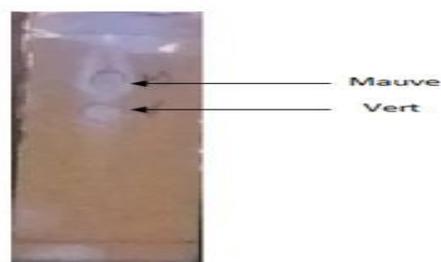


Figure 23 : sys 3 : H₂O / Ethanol/Butanol/Acide acétique (0.1 /1/1.5/3) pour l'extrait d'acétate d'éthyle

4-1/ Les valeurs de R_f des taches :

$$R_f = d/D$$

d : distance parcourue par le constituant

D : distance parcourue par le front de l'éluant (**D=5 cm**)

Les valeurs de R_f pour l'extrait d'acétate d'éthyle sont réunies dans le tableau suivant.

Tableau 8: les valeurs de R_f de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Le système d'élution	Les taches	Les valeurs de R_f
Sys1 :	Marron	0.90
Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone	jaune	0.80
	bleu	0.32
	jaune	0.10
Sys2:	Marron	0.94
H₂O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone	jaune clair	0.82
	jaune foncé	0.56
Sys 3 : H₂O / Ethano l/ Butanol/Acide acétique	Mauve	0.80
	vert	0.60

- Analyse d'extrait n-butanol

Chromatogramme 1

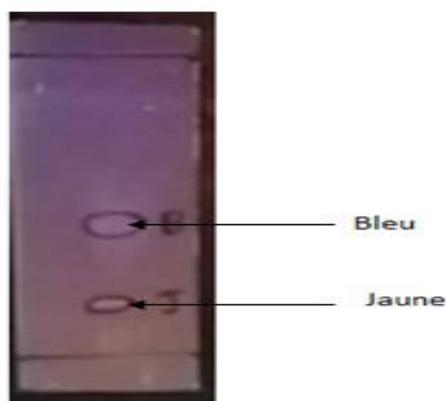


Figure 24 :sys1 Toluène/Ethanol/Méthyle éthyle cétone (4/3/3) pour l'extrait de n-butanol

Chromatogramme 2 :

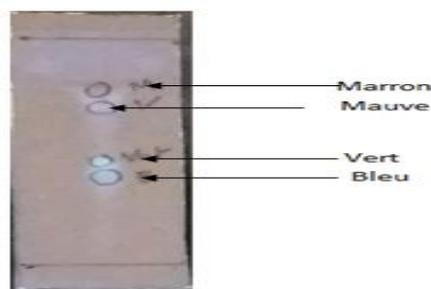


Figure 25 : sys2 :H₂O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone (0.1 /1/7) pour l'extrait de n-butanol

Chromatogramme 3 :

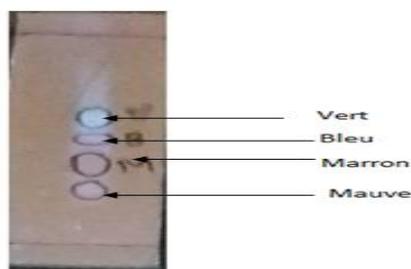


Figure 26 : sys 3 : H₂O / Ethanol/Butanol/Acide acétique (0.1 /1/1.5/3) pour l'extrait de n-butanol

4-2/ Les valeurs de R_f des taches

Les valeurs de R_f pour l'extrait de n-butanol sont réunies dans le tableau suivant.

Tableau 9 : les valeurs de R_f de l'extrait de n-butanol

Le système d'élution	Les taches	Les valeurs de R _f
Sys1 :	Bleu	0.44
Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone	jaune	0.18
Sys2:	Marron	0.78
H₂O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone	mauve	0.70
	vert	0.46
	bleu	0.40
Sys 3 :	H ₂ O / vert	0.60
Ethanol/Butanol/Acide	bleu	0.50
acétique	marron	0.40
	mauve	0.26

5- discussion des résultats

D'après les valeurs de R_f et de couleurs des taches on a pu déduire que notre espèce extraite par l'acétate d'éthyle et n-butanol contient les flavonoïdes suivants :

0.00 ≤ R_f ≤ 0.25 : les polyhydroxyflavones.

0.30 ≤ R_f ≤ 0.50 : l'oligohydroxy et les oligométhoxyflavones.

0.50 ≤ R_f ≤ 0.75 : les flavonones, les flavonols et les méthoxyflavones.

Pour les différents tests de la chromatographie sur couche mince, le but de l'utilisation de plusieurs systèmes d'éluant et de savoir le bon éluant, c'est-à-dire le système qui donne une bonne séparation dans l'objectif de l'utiliser dans la chromatographie sur colonne.

- Pour l'extrait acétate d'éthyle le meilleur système est : **Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone (4/3/3)**.
- Pour l'extrait n-butanol les meilleurs systèmes sont : **H₂O /Méthanol/ Méthyle éthyle cétone** et **H₂O / Ethanol/Butanol/Acide acétique**.

***La méthode de dilution**

On utilisé le protocole suivant pour la dilution de nos extraits :

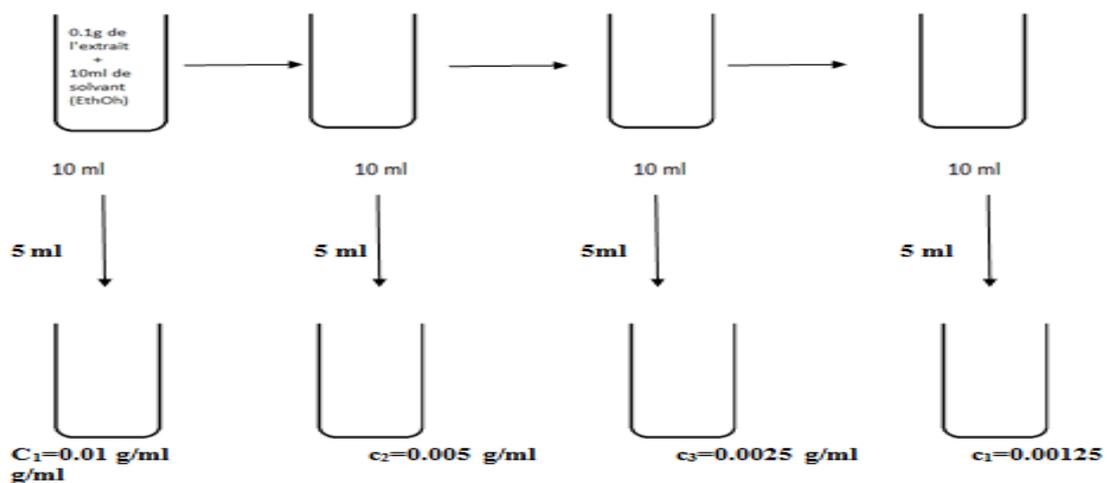


Schéma : protocole de dilution des extraits.

On a : $c = m / v$; donc $c_1 = 0.1 / 10 \implies c_1 = 0.01 \text{ g/ml}$

$c_1 v_1 = c_2 v_2 \implies c_2 = c_1 v_1 / v_2 = (0.1 \cdot 5) / 10 \implies c_2 = 0.005 \text{ g/ml}$

De la même manière , on calcule les concentrations restants :

$c_3 = 0.0025 \text{ g/ml}$; $c_4 = 0.00125 \text{ g/ml}$



Figure 27 : l'extrait d'acétate d'éthyle dilué.



Figure 28 : l'extrait de n-butanol dilué.

III.2.B. Etude de l'activité antibactérienne des extraits

Plusieurs études dans le monde ont signalé *Centurium erythraea* comme une antimicrobienne, alors que peu d'étude sur le plan local.

L'étude de l'activité antibactérienne a été préparée au niveau du laboratoire des analyses bactériologique de la société hospitalière de la santé (TOLGA) BISKRA.

Nous donc décidé de l'étudier en testant l'activité de différents extraits de *Centurium erythraea* sur deux souches à GRAM négatif et une souche à GRAM positif.

III.2.B.1. Identification des souches bactériennes

III.2.B.1.1. Classification des bactéries

- **Bactéries en forme de sphère : les cocci**

Coccies Gram positif : Nous avons les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pneumococcus*, *Enterococcus*.

Coccies Gram négatif : Nous avons le genre *Neisseria*.

- **Bactéries en forme de bâtonnet : les bacilles**

Bacilles Gram positif : Nous avons les genres *Listeria*, *Erysipelothria*, *Bacillus*, *Cynetobacter*, *Actynomyces*.

Bacilles Gram négatif : Nous avons les genres *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Francisella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrion*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*. *Benbrinis soumia*.

III.2.B.1.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle. Les staphylocoques ont un

pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entéocolites post-antibiotiques), septicémiques. *Staphylococcus epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales [65]

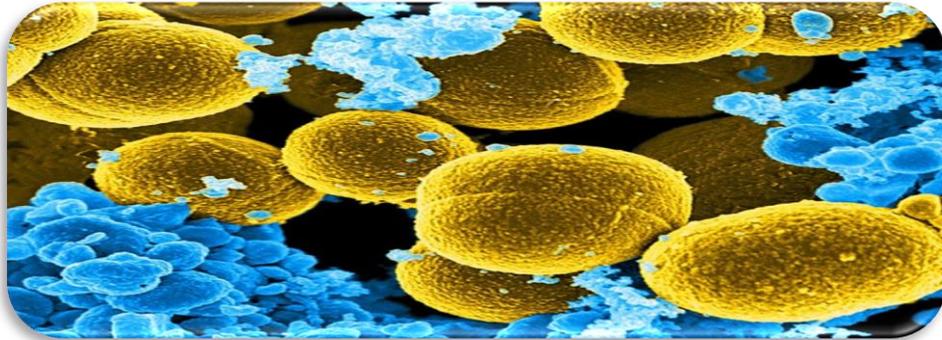


Figure 29 : Microscope de bactérie Staphylococcus aureus

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *Pseudomonas aeruginosa* en sont capables à 41°C et même 43°C; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment est assez commune dans le genre. Deux sont particulièrement fréquents et utiles pour la reconnaissance des espèces: la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme, spécifique de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*; la pyoverdine, ou pigment vert fluorescent, soluble uniquement dans l'eau et élaborée en particulier par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie.

Ceux-ci comprennent les glucides, lipides, acides aminés, acides organiques, et aussi un grand nombre de corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpénique, des stéroïdes.

Dans le genre *Pseudomonas* quelques espèces se signalent à l'attention, du fait de leur pouvoir pathogène opportuniste. *Pseudomonas aeruginosa*, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C, contrairement à *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Fréquemment isolé sur la peau

et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier.

Il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre [65]



Figure 30 : Microscope de bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

- ***Escherichia coli***

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

Escherichia coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme (108/g de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées) leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *Escherichia coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxino-gène (tourista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes [65]).

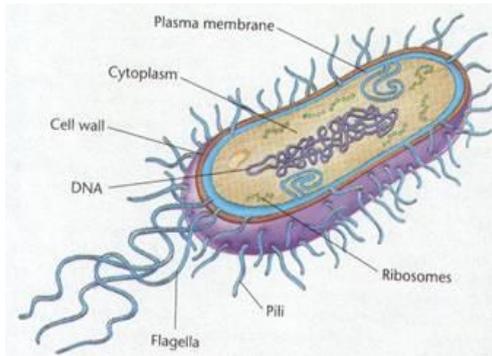


Figure31 : Microscope de bactérie E.coli

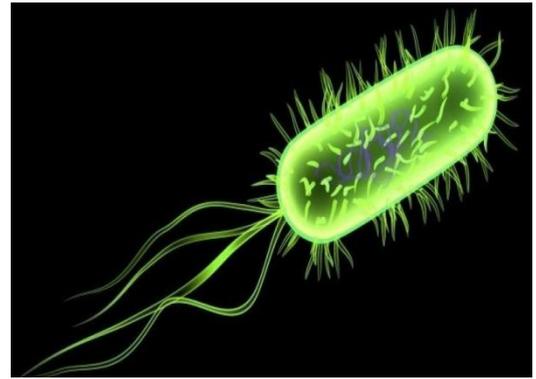


figure 32: la bactérie E.coli

III.2.B.1.3. Détermination de l'activité antibactérienne

La manipulation correcte de milieux stériles dans les tubes de culture et de boîtes de pétri nécessite des attitudes, des aptitudes et des compétences spéciales. C'est ce qui justifie le présent manuel de travaux pratiques qui vise à garantir un environnement aseptique lors de la manipulation des cultures de microorganismes, à travers l'acquisition des bonnes attitudes, aptitudes et compétences.

La procédure générale est la suivante :

- Désinfection de la zone de travail : la zone de travail est d'abord traitée avec un désinfectant pour éliminer tous les microorganismes qui y sont présents. Cette étape détruit les cellules végétales des microorganismes et les virus.
- Flambage du tube contenant les cultures : avant d'insérer l'oese ou l'aiguille refroidie dans un tube de culture, le couvercle du tube est retiré et l'embouchure du tube de culture passée à la flamme. Une fois que le prélèvement a été réalisé à l'intérieur du tube, l'embouchure du tube de culture est à nouveau passée à la flamme, avant la fermeture par le couvercle.
- Inoculation de plaques de pétri : lorsque la surface de la gélose estensemencée, le couvercle est maintenu en diagonale sur le fond de la plaque pour éviter la contamination par l'air du milieu.
- Désinfection finale : lorsque tout le travail est terminé, la zone de travail est traitée avec un désinfectant pour s'assurer que tout microorganisme déposé au cours de l'une des procédures est éliminé.(figure)



Figure 33: de milieux stériles .

° Matériel de laboratoire

Dans les laboratoires de microbiologie, divers instruments sont utilisés pour observer et manipuler les microorganismes d'une façon sécuritaire. Les petites tailles de ces organismes vivants ainsi que leur capacité pathogène potentielle, pour certaines espèces, expliquent l'utilisation de matériel spécialisé (anse de platine, écouvillon, désinfectant, autoclave, étuve, etc.).

Tableau 10 : identification de matériels de laboratoire.

Matériel	Fonctions
Autoclave	Appareil servant à la stérilisation des milieux de culture et des instruments
Anse de platine	Instrument servant à prélever des échantillons
Désinfectant	Produit chimique antimicrobien utilisé pour le nettoyage des objets ou des surfaces
Écouvillon	Instrument servant àensemencer des microorganismes sur un milieu de culture
Gélose en pétri	Boîte contenant un milieu solide permettant le développement des microorganismes
Étuve	Appareil servant à la croissance des cultures à des températures adéquates
Boîte de pétri	Contenant servant à recevoir un milieu de culture solide à base d'agar (gélose)

L'activité antibactérienne de nos extraits s'est testés en utilisant la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé. La gélose Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes pétries stérile à 4 mm d'épaisseur.

III.2.1.3. 1. Préparation de la boîte pétrie

- Laver les mains
- laver la surface de travail avec un désinfectant
- Placer la gélose MH dans une boîte pétri
- Prendre un écouvillon stérile et le mouiller avec la solution saline stérile
- Déposer l'écouvillon sur la gélose et faire un mouvement de va et vient
- fermer la boîte de pétri
- Laisser à gélifier
- Laver la surface de travail avec un désinfectant.



Figure 34 : gélose Mueller-Hinton



Figure 35 : boîtes de gélose M-H.

III.2.1.3. 2. Inoculum

- A partir d'une culture jeune des bactéries pendant 24h, un inoculum est préparé à partir des colonies bien isolées dans 5-10 ml d'eau physiologique stérile.

-laisser bien homogénéiser la suspension bactérienne

- l'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum



Figure 36: les suspensions bactériennes préparées.

III.2.1.3. 3. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir de papier wattman n°3, avec un diamètre de 6 mm, ensuite ils sont rincer bien dans les différents dilutions de nos extraits (d'acétate d'éthyle et n-butanol) et laisser imbibés le maximum de pendant 15-20 min.

Le témoin négatif était un disque imprégné avec le ethoh.

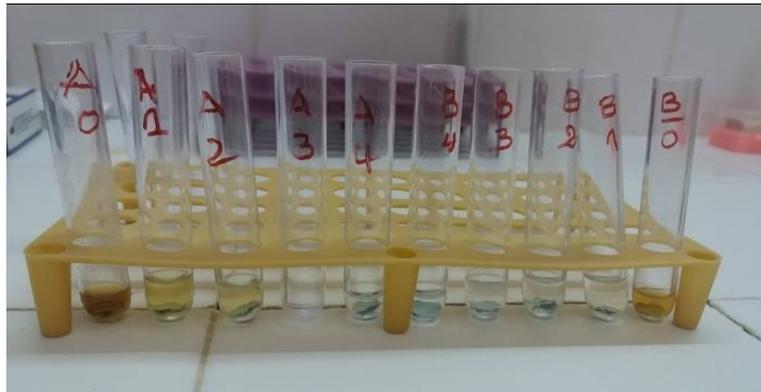


Figure37 : les disques imbibés dans les extraits.

III.2.1.3. 4. Ensemencement d'une gélose

La technique d'ensemencement est utilisée pour faire l'étude des bactéries. Elle consiste à étaler des bactéries sur un milieu de culture solide (gélose) afin de les faire croître. On peut appliquer cette technique avec des échantillons variés (bouillon, plaie, etc.). La technique aseptique d'ensemencement s'applique de la façon suivante :

- Laver les mains et la surface de travail avec le désinfectant
- Disposer sur l'aire de travail tout le matériel nécessaire en prenant soin d'être à l'aise pour travailler
- Allumer le bec bunsen
- Prendre l'anse de platine et la stériliser en la passant dans la flamme



Figure 38 : la stérilisation de l'anse de platine.

- Ouvrir le tube de bouillon (qui contaient la souche) placé dans la main opposée, avec le petit doigt de la main qui tient l'anse
- Stériliser l'ouverture du tube à la flamme
- Insérer l'anse de platine dans le tube (il n'est pas nécessaire de voir du liquide dans l'orifice)



Figure39 : extraction des bactéries en suspension.

- Stériliser de nouveau l'ouverture du tube à la flamme et le refermer
- Entrouvrir la gélose et y introduire, sans toucher au bord de la boîte
- Déposer l'anse sur la gélose et faire un mouvement de va et vient



Figure 40 : technique d'ensemencement.

- Retirer l'anse et refermer la boîte de pétri
- Tourner d'un quart de tour la boîte de pétri

- Entrouvrir la boîte de pétri de nouveau et y introduire l'anse de platine sans toucher au bord de la boîte
- Déposer l'anse sur l'extrémité de l'étalement précédent et refaire un mouvement de va et vient
- Retirer l'anse et refermer la boîte de pétri
- répéter deux autres fois et terminer le mouvement de va et vient plus large vers le centre de la gélose
- Retirer l'anse et refermer la boîte de pétri
- Retourner la boîte de pétri, couvercle sur la table
- A l'aide d'une pince stérile au bec bunsen, déposer les disques imbibés sur la surface de gélose

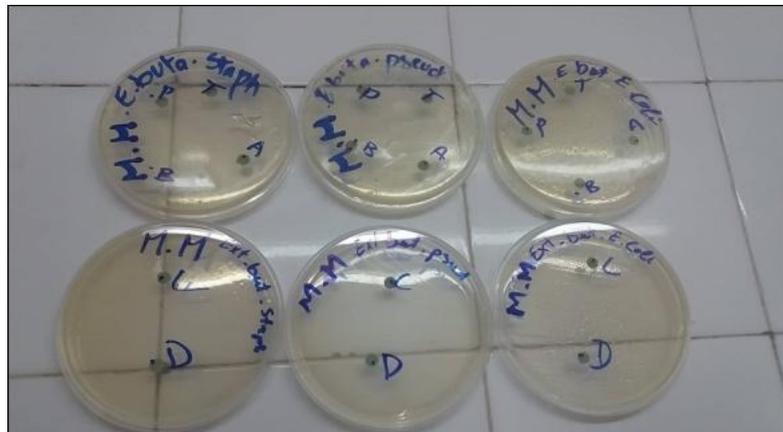


Figure 41 : déposition des disques.

- Placer les boîtes de pétri dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour permettre le développement des microorganismes.



Figure 42 : les boîtes de pétri dans l'étuve.

➤ Placer ensuite les boîtes de pétri dans le réfrigérateur pour ralentir le développement des microorganismes jusqu'à la prochaine séance de travaux pratiques. Après ces différentes manipulations, vérifier la croissance des bactéries.

Remarque

On observe après l'incubation des zones autour de quelques disques ayant diamètres variables, ce sont des zones d'inhibition ou de sensibilité indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis la souche bactérienne.

Résultats et discussion

- Pour l'extrait Acétate d'éthyle :

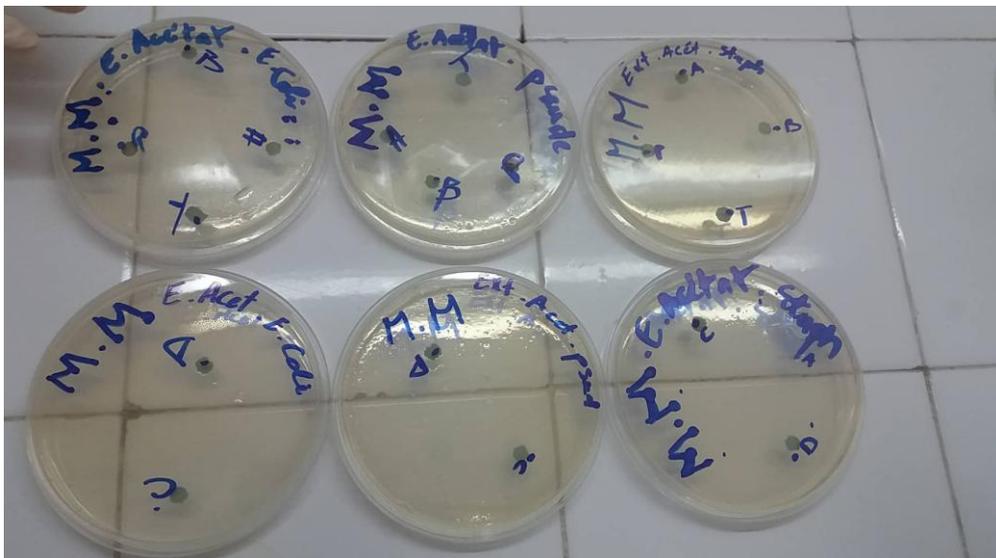


Figure 43 : les zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle testée par E. Coli, Pseudo et Staph.

Après 24h d'incubation de chaque boite, on mesure le diamètre des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée .les résultats sont présentent dans le tableau suivant :

Tableau 11 : diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

Souche bactérienne	diamètre en mm					Sensibilité des bactéries				
	A	B	C	D	T	A	B	C	D	T
E. Coli	16	14	13	10	6	++	++	+	+	-
Pseudo	18	10	9	8	6	++	+	+	+	-
Staph	16	9	9	9	6	++	+	+	+	-

- Pour l'extrait n-butanol :

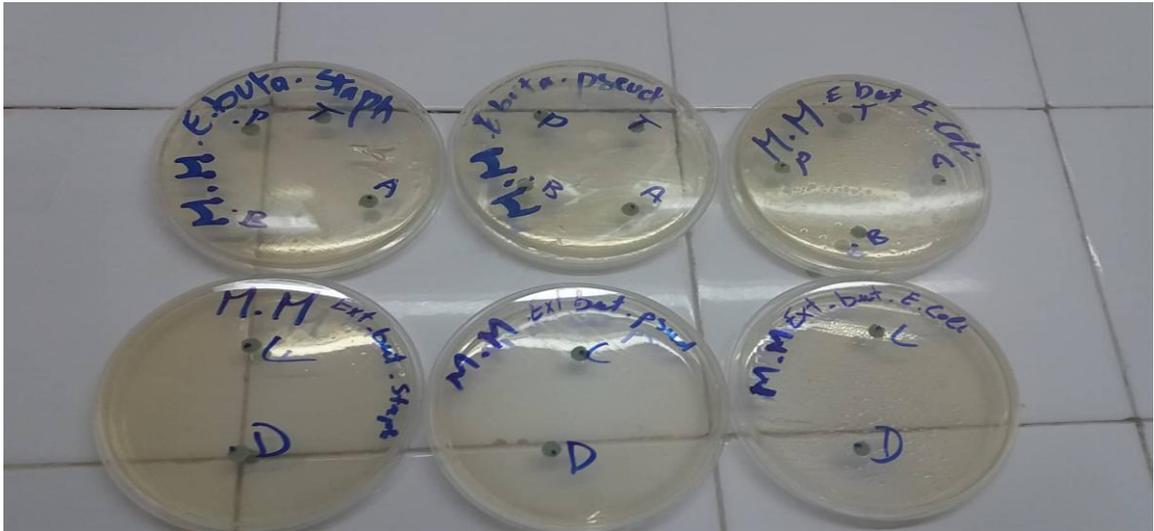


Figure 44 : les zones d'inhibition de l'extrait de n-butanol testée par E. Coli, Pseudo et Staph.

Après 24h d'incubation de chaque boîte, on mesure la diamètre des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée .les résultats sont présentent dans le tableau suivant :

Tableau 12 : diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de n-butanol.

Souche bactérienne	diamètre en mm					Sensibilité des bactéries				
	A	B	C	D	T	A	B	C	D	T
E. Coli	17	12	10	10	6	++	+	+	+	-
Pseudo	19	13	12	10	6	+++	+	+	+	-
Staph	20	14	13	11	6	+++	++	+	+	-

Comme la relation entre le diamètre de la zone d'inhibition et la sensibilité de la bactérie est donnée comme suit :

- $D < 8$: la bactérie résistant ou non sensible (-)
- $8 < D < 14$: la sensibilité est limité (+)
- $14 < D < 18$: très sensible (++)
- $D > 18$: la bactérie extrêmement sensible (++++)

Discussion :

On a observé une bonne activité avec l'extrait de n-butanol vis-à-vis à **Staphylococcus** et **Pseudomonase** avec une zone d'inhibition de **20-19 mm**.

Les résultats montrent que :

Toutes les souches bactériennes étudiées résistantes ou non sensibles pour **EtOH**.

❖ **Escherichia.Coli:**

-Sensibilités limitées pour toutes les dilutions des deux extraits sauf à la solution **A** et **B** d'extrait acétate d'éthyle (très sensible) aussi la dilution **A** de n-butanol.

❖ **Pseudomonas aeruginosa :**

- extrêmement sensible pour la dilution **A** de n-butanol
- très sensible pour la dilution **A** d'acétate d'éthyle
- sensibilité limitée pour les dilutions restantes

❖ **Staphylococcus aureus:**

- Extrêmement sensible pour la dilution **A** de n-butanol
- très sensible pour la dilution **A** d'acétate d'éthyle et pour la dilution **B** de n-butanol
- sensibilité limitée pour les dilutions restantes



Conclusion
générale

Conclusion générale

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien être des populations surtout des plus démunies.

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et l'activité biologique (anti bactérienne) des extraits brut(métabolites secondaires) préparés par une méthode d'extraction (macération) d'une espèce médicinale *Centurium erythraea* .*l'extraction de ces métabolites basée sur leur solubilité dans plusieurs solvants organiques de polarités différentes.*

Nous nous sommes intéressés à l'étude des substances très efficaces dans le domaine de la chimie pharmaceutique en raison de ses propriétés thérapeutiques, à savoir les flavonoïdes.

Dans la première étape de ce travail, nous avons séparé deux extrais purs (l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de n-butanol), sur la base de solutions de polarisation croissantes.

Les analyses qualitatives effectuées par chromatographie sur couche mince de gel de silice, suivies par différents systèmes d'élution, et après exposition au rayonnement ultraviolet, ont montré de nombreuses taches colorées, signe de la richesse de l'extrait en substances efficaces, des composés phénoliques.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet antibactérien de nos extraits en les exposant à trois types de bactéries telle que l'E-coli, la Pseudomonas et Staphylococcus selon la méthode antibiogramme, cette étude a montré que la plupart des souches bactériennes testées sont sensibles aux extraits de notre plante surtout contre la **Staphlococcus** et **Pseudomonase** pour l'extrait de n-butanol.

Nous avons conclu dans cette étude que les deux extraits possèdent une capacité antibactérienne.

Donc notre plante présente des quantités essentielles des flavonoides qui lui permettent d'entrer dans la thérapeutique naturelle.

Références bibliographique

- [1] Jurd, L. and Horowitz, R., Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, P. 107-2055. 1962
- [2] Ozenda, P., Flore du Sahara, Edition du CNRS, Paris . 1983
- [3] Bardeau, F.. La pharmacie du Bon Dieu, Paris, Edition Stock, Vol.01, 334p. 1973
- [4] Azaizeh, H., Saad, B., Khalil, K., Said, O.. The state of the art of traditional arab herbal medicine in Eastern region of the mediterranean: a review.eCAM 3 (2)229-235. 2006
- [5] Moatti, R., Fouron, R., Donadieu, Y.. La phytothérapie : thérapeutique différente. Paris, édition Librairie Maloine S.A., vol. 01, 245p. 1983
- [6] livre larousse encyclopedie des plantes medicinales identification, préparations, soins 10p.
- [7] Pr. J. Vercauteren Plan du cours de Pharmacognosie - Formation Commune de Base ; édition 2011.
- [8] futura-science –sante-definitions-medecine-plante-medicinale-11529
- [9] larousse,encyclopédie des plantes médicinales,2001
- [10] J. B. Harborne, The flavonoïds: advances in research since1980, p. 285-290. published in 1988 by Chapman and Hall
- [11] Gray A.I., Waterman P.G., 1978, Phytochemistry., 17, 845.
- [12] Harborne.J.B, Swain.T. 1969, Perspectives In Phytochemistry, Academic Press, London, New York.
- [13] WAYMEL J., DUFAY S., ZAMBETTAKIS C., – Plan de conservation de la Petite centaurée vivace (*Centaurium portense*). ANDRA. Villers-Bocage : Conservatoire botanique national de Brest, 38p + annexes. 2015
- [14] Doctissimo santé centaurée Révision médicale : Dr Jesus Cardenas, Directeur médical de Doctissimo, 27 janvier 2017
- [15] Urquiaga, I. et Leighton, F.. Plant polyphenol antioxidant and oxidative stress. Biological Research, 33(2): 55–64. 2000
- [16] Harborne J.B. and Williams C.A.. Advances in flavonoids research since 1992. Phytochemistry, 55: 481–504. 2000

- [17] Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien *ar* Ahmed Bessas Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes - Ingénieur d'état en biologie option controle de qualité et analyses 2008
- [18] (W- Erdman *et al*., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., *The Journal of Nutrition*, 1 March 2007).
- [19] -Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, 33 : 2-16.
- [20] Balasundram N., Sundram K. ET SAMAN S., 2006-phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, vol. 99,N°1 ,pp.191-203
- [21] De Rijke, E., Out P., Niessen, W. M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *JChromatography A*.1112: 31-63(2006)
- [22] Memoire pour obtenir le grade de magister etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece *inula crithmoides l*. Présenté par benguerba adlen option phytochimie universite mentouri constantine mai 2008
- [23] Université Mentouri de Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Animale En vue de l'obtention du diplôme de : DOCTORAT EN SCIENCES OPTION : PHYSIO-TOXICOLOGIE Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Présenté par : **Melle AKROUM Souâd** Année universitaire : 2010-2011.
- [24] Erlund, Iris.. «Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology». *Nutrition Research*. vol. 24, no 10, p. 851-874. 2004
- [25] Nichenametla, S. N., T. G. Taruscio, D. L. Barney et J. H. Exon.. «A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer». *Crit Rev Food Sci Nutr*. vol. 46, no 2, p. 161-183. 2006
- [26] Parkinson, T. M., et J. P. Brown.. «Metabolic fate of food colorants». *Annu Rev Nutr*. vol. 1, p. 175-205. 1981
- [27] Harborne.J.B. (Eds), phytochemical dictionary of the leguminosae, vol.1, Chapman and Hall, London 1994, pp.XX-XXII.
- [28] Stafford.H.A, role of Flavonoids in symbiol and defuse functions in legume roots, *Bot.rev* (1997) 63 27-39.

- [29] Eyton.W.B, Ollis.W.D, Sutherland.I.O, Gottlieb.O.R, Tavira magalhaes.M. *Proc. Tetrahedron*, (1965) 21, 2683.
- [30] Bruneton.J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, 1999
- [31] Hutzler *et al*, *Journal of Experimental Botany*, 1 June 1998
- [32] Justen.U,et al , *Journal of Chromatography A* 1998.
- [33] (Da silva.E.J.A et al ... , Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm.Pharmacol.* 1994)
- [34] (Mookerjee.B.K et al..., The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses . 1986)
- [35] (Roengsumran.S et al ... , Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J.Scient.c Research of Chulalongkorn University* 2000).
- [36] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (7), 1035-42.
- [37] Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 80 (11): 1799-808. 2009
- [38] Spedding G, Ratty A, Middleton E. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 1989, 12 (2): 99-110.
- [39] Choi HJ, Song JH, Park KS. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37 (3-4): 329-33.
- [40] Ariefdjohan MW, Savaiano DA. Chocolate and cardiovascular health: is it too good to be true? *Nutr. Rev.* 2005, 63 (12-1): 427-30.
- [41] Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systematic review. *Nutr. Metab.* 2006, 3: 2.
- [42] [Halliwell.B, Cross.C. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Persp.* 1994].
- [43] Frenkel.K, Chrzan.K. Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes.*Carcinogenesis* 1987

- [44] Stadtman.Earl.R. Protein oxidation and aging. Science 1992.
- [45] SUBIRADE I et al ..., Catechin protection of 3T3 Swiss fibroblasts in culture under oxidative stress. Biol. trace elem. Res. ,1995.
- [46] Fuhrman.B et al ..., Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation.1995.
- [47] . Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews., 12 (4) : 564-570.
- [48] Marfek A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges
- [49] Chaudhry.P.S,et al ...,Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin.1995.
- [50] Ong.K.C,et al... Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol.1997.
- [51] Hertog.M.G et al.. antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.Lancet. 1993.
- [52] Milane, H., La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg . 2004
- [53] Monique Simmonds, Phytochemistry , 2001.
- [54] F. Chemat, Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris, 2011
- [55] Mahmoudi et al., 2013 ; Talbi et al., 2015
- [56] Gérard cote, techniques de l'ingénieur, 2017
- [57] Dimitri jacquier-roux, enseignant de sciences-physiques ; le lycée Ella Fitzgerald 2019
- [58] Cours méthodes d'analyses chromatographiques, Dr. Boucheloukh hadjira, université de Jijel
- [59] Benguerba Adlen, étude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece insula crithmoides l. universite mentouri constantine2008
- [60] MAHDJAR Salha, Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante Matricerai pubescents et à l'évaluation de son activité antioxydant. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA2013
- [61] SAFFIDINE KARIMA 2015 Thèse Présentée par SAFFIDINE KARIMA Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de Carthamus caeruleus L. et de Plantago major L

- [62] Markham, K.R. and Geiger, H., The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. HARBORNE, Chapman & Hall. London . 1993
- [63] Raffaelli ,A., Selected Topics and Mass Spectrometry in the Biomolecular sciences . Kluwer Academic. The Netherlands. 1997
- [64] Gunther, H., La spectroscopie de RMN, édition Masson, Paris. 1994
- [65] Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris. 1995

Annexes

Annexe 1

Matériels et produits utilisés :

Récipients et verreries	Accessoires	Produits	Appareillage
<ul style="list-style-type: none">• Ampoule à décanter• Ballon un col• Buchner• Entonnoir simple• Eprouvettes graduées• Béchers gradués• Fioles erlenmeyer• Fioles à jauge• Creuser• Tubes à essais• Boîtes de pétrie• Cuve• Pipete pasteur	<ul style="list-style-type: none">• Support métalliques• Pince• Spatule en acire• Spatule en verre• Tuyaux• Papier paraffine• Papier filtre• Verre de montre• Thermomètre• Plaque de gel de silice• Séchoire	<ul style="list-style-type: none">• Eau distilé• Ethanol• Méthanol• Chloroforme• Ether de pétrole• Acétate d'éthyle• N-butanol• Toluène• Méthyle éthyle cétone• Eau physiologie• Acide acétique• Gélose mueller-hinton	<ul style="list-style-type: none">• Lampe UV• Etuve• Bec benzéne• Evaporateur rotatif• Autoclave

Résumé

A la lumière de cette recherche phytochimique, on a étudié les parties aérienne de la plante *Centurium erythraea* qui dotée d'une grande importance pharmaceutique dans le monde et dont le goût est très amer.

On a employé les diverses méthodes d'analyses à savoir : la macération, la décantation et la chromatographie sur couche mince (CCM) qui ont permis de détecter quelques composés organiques dont leurs colorations sont : marron, jaune, violet...qui sont des flavonoïdes.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé montre que l'extrait acétate d'éthyle et de n-butanol possèdent une activité antibactérienne sur les souches testées.

Mots clés : *Centurium erythraea*, macération , chromatographie, flavonoïdes, L'activité antibactérienne.

Abstract

In the light of this phytochemical research, we have studied the aerial parts of the plant *Centurium erythraea* which has a great pharmaceutical importance in the world and whose taste is very bitter.

Various methods of analysis were used, namely: maceration, decantation and thin layer chromatography (TLC), which allowed to detect some organic compounds whose colorings are: brown, yellow, purple ... which are flavonoids.

The disk diffusion method in an agar medium shows that the ethyl acetate and n-butanol extract have antibacterial activity on the strains tested.

Key words: *Centurium erythraea*, maceration, chromatography, flavonoids, antibacterial activity

ملخص

في ضوء هذا البحث الكيميائي النباتي قمنا بدراسة الأجزاء الهوائية لنبتة القنطريون الصغير الذي له أهمية صيدلانية كبيرة في العالم و الذي يكون مذاقه مرا للغاية.
تم استخدام طرق مختلفة للتحليل و هي النقع الفصل و الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و التي سمحت بالكشف عن بعض المركبات العضوية التي تكون لها لونها البني 'اصفر' بنفسجي.....و هي مركبات الفلافونويد.
توضح طريقة نشر القرص في وسط جيلوزي أن مستخلص أسيتات الإيثيل والبوتانول له نشاط مضاد للجراثيم على السلالات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: القنطريون الصغير ، النقع ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، الفلافانويد ، النشاط المضاد للبكتيريا

