

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Etude phytochimique et biologique d'une plante du genre *Athamanta* de la famille des Apiaceae

---

Présenté par : *SELMANI Nour El Houda*

Le 23/06/2022

*DJENDLI Djihane*

Jury d'évaluation :

M<sup>me</sup>. KHALFALLAH Assia

MCA. CUM-Mila

Encadreur

M<sup>me</sup>. BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM-Constantine 1

Examineur 1

M<sup>me</sup>. BERREHAL Djemaa

Pr. UFM-Constantine 1

Examineur 2

Année universitaire  
2021 - 2022

## **REMERCIEMENTS**

*Avant tout nous tenons à remercier et rendre grâce à Allah Le Tout Puissant pour nous Avoir Donné le courage, la volonté et la patience de mener à bon terme ce travail.*

*A M<sup>me</sup> **KHALFELLAH Assia**, nous adressons nos profonds remerciements pour l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer, pour son soutien, sa bonne attention pendant notre travail, et pour ses qualités humaines.*

*Nos remerciements vont aussi à M<sup>me</sup> **KABOUCHE Zahia** pour nous avoir accueillies au sein du laboratoire d'obtention de substances Thérapeutiques (LOST), pour ses encouragements, ses idées, sa disponibilité et pour sa bienveillance.*

*Nous tenons également à remercier M<sup>me</sup> **BOUTAGHANE Naima** pour avoir accepté de présider le jury et M<sup>me</sup> **BERREHAL Djemaa** pour avoir accepté d'examiner notre mémoire*

*Merci à tout l'ensemble des enseignants du département des sciences et de la vie.*

*Nous n'oublions pas aussi les deux doctorantes **CHEBCHOUB Soumia & BOUBERTAKH Hadjer** pour leur aide, disponibilité, ....*

***Nour El-Houda et Djihane***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail...*

*À mes chers **parents** qui m'ont appris la responsabilité et sens du travail.  
Pour leurs efforts, leurs sacrifices, et leurs encouragements, pendant mes études  
Qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite*

*À mes chères sœurs: **Imene & Wafa** que j'adore énormément*

*À toute ma belle famille*

*À toutes mes amies et collègues, qui sont toujours à mes côtés, et m'ont soutenue pendant les  
moments difficiles.*

*À ma belle amie **Rahma***

*À ma chère enseignante, **Layla BEN SAED** et tous mes professeurs, qui ont encadré mes  
études*

*À mon cher père*

*Pour sa compréhension et ses encouragements, durant la réalisation de ce mémoire*

***Nour EL Houda***

## ***Dédicace***

*Je tiens d'abord à remercier **ALLAH** Le Tout Puissant de m'Avoir Donné la foi et de m'avoir permis d'en arriver là.*

*A Ma Chère mère l'enseignante **Dalila***

*Je dédie ce succès à l'âme pure de ma mère, je suis là comme tu voulais me voir, mais le destin a décidé de te prendre, tu étais mon modèle et la source de mon bonheur .sans toi tout ce qui est beau dans ma vie s'est éteint et n'a plus de sens. **ALLAH** lui Accorde Sa Miséricorde et l'Accueille dans son vaste paradis.*

*A mon chère Père **Khemissi***

*Mon exemple éternel, je suis là grâce à ses prières, ses sacrifices et pour il me voit réussir, Qu'**ALLAH** le Protège.*

*A ma chère adorable Sœur **Yasmine** et mon chère frère **Badreddine** pour leur encouragements durant mon chemin d'étude.*

*Le chef de département de biochimie monsieur **NASSIB Youssef** :  
Ma spéciale gratitude et mes grands remerciements pour son soutien et sa disponibilité et pour ses efforts.*

**DJIHANE**

## Abréviations et symboles

**BuOH** : Buthanol

**MeOH** : Méthanol

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : dichloromethane

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**DPPH** : 2,2 –Di- Phényl-1-Picryl-Hydrazyl

**ABTS**: 2,2 –azino- bis 3- ethylben zothiazoline-6-sulfonic acide

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>** : Persulfate de potassium

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

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

**HCL** : Acide chlorhydrique

**NC** : Néocuproéne

**A** : Absorbance

**AA** : Activité antiradicalaire

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**VLC** : Chromatographie Liquide sous vide

**CUPRAC**: Cupric Reducing Antioxidant- Capacity

**RMN <sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone .

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

**J(Hz)** : Constante de couplage exprimée en Hertz

**R<sub>f</sub>** : Rapport frontal.

**v/v** : Volume par Volume.

**ppm** : Parties par million

**CC** : Chromatographie sur colonne

**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition 50%.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Les différents composés des plantes de la famille des Apiaceae	<b>02</b>
<b>Figure 2</b>	Les caractéristiques générales de la famille des Apiaceae	<b>03</b>
<b>Figure3</b>	Carte de répartition de la famille des Apiaceae	<b>04</b>
<b>Figure 4</b>	Les différentes parties des plantes du genre <i>Athamanta</i>	<b>05</b>
<b>Figure 5</b>	Exemple des espèces appartenant au genre <i>Athamanta</i> ( <i>Athamantaarétensis</i> L) à droite et ( <i>Athamantasicula</i> L) à gauche.	<b>06</b>
<b>Figure 6</b>	Structures des flavonoides isolés du genre <i>Athamanta</i>	<b>07</b>
<b>Figure 7</b>	Structure del'acide gras isolé du genre <i>Athamanta</i>	<b>08</b>
<b>Figure 8</b>	Structures des phenylpropanoïdes isolés du genre <i>Athamanta</i>	<b>08</b>
<b>Figure 9</b>	Squelette de base des flavonoïdes	<b>09</b>
<b>Figure 10</b>	les différentes classes des flavonoides	<b>10</b>
<b>Figure 11</b>	Les deux bondes d'absorption des flavonoïdes	<b>15</b>
<b>Figure 12</b>	Réduction du DPPH par le phénol	<b>21</b>
<b>Figure 13</b>	Réduction du complexe néocuproïne- cuivre.	<b>21</b>
<b>Figure 14</b>	Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de l'ABTS <sup>•+</sup>	<b>22</b>
<b>Figure 15</b>	Les différentes étapes de macération, de filtration et d'évaporation de l'extrait hydroalcoolique d'une plante du genre <i>Athamanta</i>	<b>23</b>
<b>Figure 16</b>	Protocole d'extraction de l'espèce <i>Athamanta</i> .	<b>24</b>
<b>Figure 17</b>	Schéma de fractionnement par VLC de la phase <i>n</i> -BuOH	<b>25</b>
<b>Figure 18</b>	Chromatographie sur colonne de polyamide de la fraction <b>F2</b> .	<b>26</b>
<b>Figure 19</b>	Schéma résume les différentes étapes de séparation de l'extrait <i>n</i> -BuOH	<b>28</b>
<b>Figure 20</b>	Série spectrale UV –Visible du composé <b>P1</b>	<b>35</b>
<b>Figure 21</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H (250MHz, C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O) du produit <b>P1</b> .	<b>37</b>
<b>Figure 22</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>38</b>
<b>Figure 23</b>	Courbes de pourcentage d'inhibition du DPPH par les trois extraits EtOH,	<b>40</b>

	<i>n</i> -BuOH et ACOEt.	
<b>Figure 24</b>	Photo prise lors du dosage de l'activité anti radicalaire DPPH	<b>40</b>
<b>Figure 25</b>	Courbes de l'activité antioxydante au CUPRAC par les trois extraits	<b>42</b>
<b>Figure 26</b>	Photo prise lors du dosage de l'activité CUPRA	<b>43</b>
<b>Figure 27</b>	Les courbes de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les trois extraits.	<b>45</b>
<b>Figure 28</b>	Photo prise lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS	<b>45</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Les propriétés thérapeutiques des espèces du genre <i>Athamanta</i>	<b>06</b>
<b>Tableau 2</b>	Les flavonoïdes isolés du genre <i>Athamanta</i>	<b>07</b>
<b>Tableau 3</b>	L'acide gras isolé du genre <i>Athamanta</i>	<b>07</b>
<b>Tableau 4</b>	Lesphenylpropanoïdes isolés du genre <i>Athamanta</i>	<b>08</b>
<b>Tableau 5</b>	la relation entre le Rf et la structure flavonique	<b>14</b>
<b>Tableau 6</b>	l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes I et II en milieu méthanolique pour quelque type de flavonoïdes	<b>16</b>
<b>Tableau 7</b>	Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des réactifs	<b>17</b>
<b>Tableau 8</b>	Les masses des extraits	<b>24</b>
<b>Tableau 9</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -BuOH	<b>26</b>
<b>Tableau 10</b>	Résultats du regroupement final des fractions de la colonne	<b>27</b>
<b>Tableau 11</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction <b>f5</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 12</b>	comportement chromatographique du composé <b>P1</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 13</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du produit <b>P1</b> .	<b>33</b>
<b>Tableau 14</b>	Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H ( 250 MHz , C3D <sub>6</sub> O) du <b>P1</b>	<b>36</b>
<b>Tableau 15</b>	La densité optique (DO) mesurée et la quantité des composés polyphénoliquescalculé des trois extraits.	<b>38</b>
<b>Tableau 16</b>	Pourcentage d'inhibition du DPPH par les trois extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt.	<b>39</b>
<b>Tableau 17</b>	L'absorbance de l'activité antioxydante des extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt au CUPRAC .	<b>42</b>
<b>Tableau 18</b>	Les pourcentages d'inhibition de l'ABTS par les extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt	<b>44</b>



# Table des matières

Introduction générale.....	01
<b>Chapitre I : Aperçu Bibliographique</b>	
I .1. La famille des Apiaceae.....	02
I .1.1. Description.....	02
I .1 .2. Position systématique de la famille des Apiaceae.....	02
I .1 .3. Les caractéristiques générales de la famille des Apiaceae.....	03
I .1 .4. Répartition géographique.....	03
I .1 .5. Utilisation traditionnelle.....	04
I .2 . Le Genre <i>Athamanta</i> .....	04
I .2 .1 . Position systématique du genre <i>Athamanta</i> .....	05
I .2 .2 . Quelques activités biologiques reconnues.....	06
I .2 .3.Principaux métabolites secondaires du Genre <i>Athamanta</i> .....	06
II . 1. Les flavonoides.....	09
II . 1 .1 . Classification des flavonoides.....	09
II .1 .2 . Propriétés des flavonoides.....	11
II .1 .2 .1. L'activité antioxydante.....	11
II .1 .2 .2. L'activité antibactérienne.....	11
II .1 .3 . L'étude phytochimique des flavonoides.....	12
II .1 .3 .1. Extraction des flavonoïdes.....	12
II .1 .3 .2. Séparation et Purification des flavonoïdes.....	12
III .1 . Les techniques d'identification structurale.....	13
III .1 . 1. Facteur de retardement et comportement chromatographique.....	13
III .1 .2 .La spectrophotométrie UV visible.....	14
III .1 .3 . La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	18
III .1 .3 .1. La RMN du proton (RMN <sup>1</sup> H).....	19
III .1 .3 .2. La RMN du carbone 13(RMN <sup>13</sup> C).....	19
IV. Activité antioxydante.....	19
IV.1. Définition.....	19
IV.2. Principaux tests d'activité antioxydante.....	20
IV.2.1. Inhibition du radical stable DPPH.....	20

IV.2.2. Test de la capacité antioxydant par réduction du cuivre (CUPRAC).....	21
IV.2.3. Test de la capacité du radical-cation ABTS.+.....	22

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

I. Etude phytochimique de la plante .....	23
I.1. Récolte du matériel végétal.....	23
I.2. Extraction de la plante .....	23
I.3. Séparation de l'extrait <i>n</i> -BuOH .....	25
I.4. Etude de la fraction F2 .....	25
I.5. Etude de la sous fraction f5 .....	28
II. Dosage des polyphénols.....	29
II.1. Principe du dosage.....	29
II.2. Protocole expérimental .....	29
III. Évaluation du pouvoir antioxydant.....	30
III.1. Protocole du test DPPH .....	30
III.2. Protocole du test CUPRAC .....	31
III.3. Protocole du test ABTS Préparation des solutions.....	31

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

I. Identification du composé <b>P1</b> .....	33
I.1. Comportement chromatographique .....	33
I.2. Données spectroscopiques .....	33
I.2.1. Données spectroscopiques UV-Visible .....	33
I.2.2. Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H .....	36
II. Dosage des composés phénoliques .....	38
III. Activité antioxydante.....	39
III.1. Test du DPPH des extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt.....	39
III.2. Test du CUPRAC des extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt.....	41
III.3. Test de l'ABTS des extraits EtOH, <i>n</i> -BuOH et ACOEt.....	44
Références bibliographiques.....	47
Conclusion générale.....	52

# Introduction générale

## Introduction générale

---

Les études phytochimiques basées sur la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle sont devenues de plus en plus nombreuses.

Le règne végétal représente une source importante de molécules actives.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologique inédites.

Il existe environ 500 000 plantes sur terre, 100 000 d'entre elles, environ possèdent des propriétés médicinales dû à leur principe actif qui agissent directement sur l'organisme [1].

Un grand nombre de plantes, aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent divers domaines d'application à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture [2].

Le continent africain est un des continents fourni d'une biodiversité la plus riche dans le monde, toutes les plantes supérieurs ont la capacité de produire les métabolites secondaires mais entrés faible quantité comme les composés phénolique, flavonoïdes..... Etc.

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (chimistes, biologistes, pharmacologues etc...).

Ce mémoire s'intéresse à une famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence en forme d'ombelles et qui est aujourd'hui nommée Apiaceae, elle comprend des plantes alimentaires comme la carotte le céleri, le fenouil... et des plantes condimentaires comme le carvi, la coriandre, le cumin... c'est la famille riche en huile essentielle [3].

Notre travail sera présenté comme suit :

- Chapitre I: consacré aux aspects botaniques incluant une présentation de la famille Apiaceae et le genre *Athamanta* suivi d'un aperçu sur les flavonoïdes et l'activité antioxydante.
- Chapitre II : contient la partie expérimentale phytochimique et biologique.
- Chapitre III : comprend la présentation des résultats obtenus suite à cette étude phytochimique et biologique.
- Il se termine par une conclusion générale

# Chapitre I

## Aperçu bibliographique

## I. La famille des Apiaceae:

### I.1.1. Description :

La famille des Apiaceae, également appelées Ombellifères, représente des plantes à fleurs, c'est une grande famille de 3700 espèces réparties en 455 genres [4]. Les Apiaceae sont représentées par quelques arbres et arbustes, mais pour la plupart, par des plantes herbacées annuelles, bisannuelles. C'est une famille très homogène, plus facile à reconnaître au contraire par les genres les espèces sont parfois difficiles à distinguer. Les feuilles des Apiaceae sont charnues, parfois rigides et arrangées de manière alternée. Ecraser les feuilles permet souvent de faire dégager une odeur aromatique ou fétide. Les fleurs sont hermaphrodites, disposées en ombelles et composées de 5 pétales. La pollinisation se fait par des mouches, moustiques, coléoptères ou abeilles. Les fruits produits ne sont pas charnus, les graines sont ensuite dispersées par le vent.



**Figure 1:** les différents composés des plantes de la famille des Apiaceae

### I. 1.2. Position systématique de la famille des Apiaceae [5].

**Règne:** Planta

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous –embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Dicotyledonae

**Sous –classe:** Dialypetales

**Ordre:** Apiales

**Famille:** Apiaceae

**I.1.3. Les caractéristiques générales de la famille des Apiaceae :**

La famille des Apiaceae est une famille de plantes dicotylédones présente les caractéristiques suivantes:

Inflorescence typique est une ombelle d'où l'appellation d'Ombellifères ou Umbelliferae, nom alternatif, cependant quelques espèces de la famille ne forment pas d'ombelles, Feuilles alternes, composées, pennées, au pétiole engainant au niveau des nœuds, Tige creuse et dotée de canaux sécréteurs de résines et d'essences odorantes, Fruits secs doubles (dénommés diakènes).

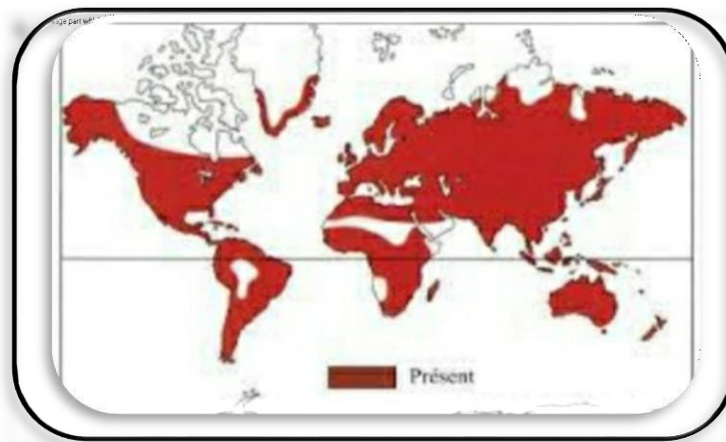
Cette famille relativement homogène, à répartition cosmopolite, comprend près de 3700 espèces réparties en 455 genres [6], surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs, après les Orchidacées, les Astéracées et les Fabacées par le nombre d'espèces. Plusieurs de ces espèces sont des légumes ou donnent des condiments appréciés, mais quatre sont mortellement toxiques comme la Grande ciguë, la Petite ciguë, l'Énanthe safranée et le Cerfeuil des fous



**Figure 2:** les caractéristiques générales de la famille des Apiaceae

**I. 1.4. Répartition géographique :**

La famille des Apiaceae est répartie sur la majeure partie du globe, dans les régions tempérées de l'hémisphère nord et les montagnes tropicales relativement rare en zone tropicale [7].



**Figure 3:** carte de répartition de la famille des Apiaceae

#### **I.1.5. Utilisation traditionnelle:**

Plusieurs Apiaceae sont utilisées comme « légumes » (Carotte, Fenouil, Céleri (Opium...)) et comme condiment : feuilles de Persil, Cerfeuil, Angélique, semences de Cumin, Carvi, Coriandre... Le Khalla (*Ammi visnaga*), est employé comme antispasmodique et comme vaso-dilatateur des coronaires : l'essence d'Anis vert à des propriétés stomachiques [8].

D'après certaines espèces ont été utilisés en médecine traditionnelle comme antiseptique, diurétiques, dans le traitement de la sclérose, et pour expulser les calculs rénaux [9].

#### **I.2. Le Genre *Athamanta*:**

Le genre *Athamanta* (nom du grec *Ath amas*, montagne de Crète d'où se trouve la plante) est un genre de plante à fleurs de la famille des Apiaceae. C'est une plante endémique du sud de l'Europe et du nord de l'Afrique. dont les fleurs sont principalement blanches à cinq pétales, velus en dehors, à peine échancrés, avec une pointe recourbée en dedans. Les ombelles et les ombellules sont munies d'une collerette à plusieurs folioles simples, étroites et membraneuses. Le fruit est velu, plus de deux fois plus long que large, chaque moitié du fruit porte 5 côtes égales arrondies, peu saillantes [10].



Le genre *Athamanta* est constitué de plantes grisâtre tomenteuse des rochers verticaux, surtout calcaires. Les feuilles sont molles [11].



**Figure 4:** les différentes parties des plantes du genre *Athamanta*

Le Genre *Athamanta* est une plante endémique du sud de l'Europe et du nord de l'Afrique. Le genre comprend **9 espèces** au Total [12].

#### **I.2.1. Position systématique du genre *Athamanta* [13]:**

**Règne:** Plantae

**Division:** Magnoliophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Ordre:** Apiales

**Famille:** Apiaceae

**Sous-famille:** Apioideae



**Figure 5:** exemple des espèces appartenant aux genres *Athamanta* (*Athamanta arétensis* L) à droite et (*Athamanta sicula* L) à gauche.

### I.2.2. Quelques activités biologiques reconnues :

Des études limitées ont été reportées sur les extraits obtenus à partir des espèces du genre *Athamanta*:

**Tableau 1:** Les propriétés thérapeutiques des espèces du genre *Athamanta*

Propriété thérapeutique	Espèce	Référence
Antimicrobienne Antioxydante	<i>A. Turbith subsp .hungarica</i>	[14]
Antimicrobienne Antioxydante	<i>Turbith subsp. haynaldii</i>	[14]
Antimicrobienne Antiproliférative Antibactérienne	<i>A. sicula</i> L.	[15]

### I.2.3. Principaux métabolites secondaires du genre *Athamanta* :

Une étude chimique a été réalisée sur trois espèces: *A. macrophylla*, *A. Turbith subsp* et *A. sicula* permis d'identifier des principaux métabolites secondaires qui sont majoritairement des **flavonoïdes**, **acide gras** et **composées phénylpropanoïdes**.

- Les flavonoïdes:

**Tableau 2:** Les flavonoïdes isolés du genre *Athamanta*

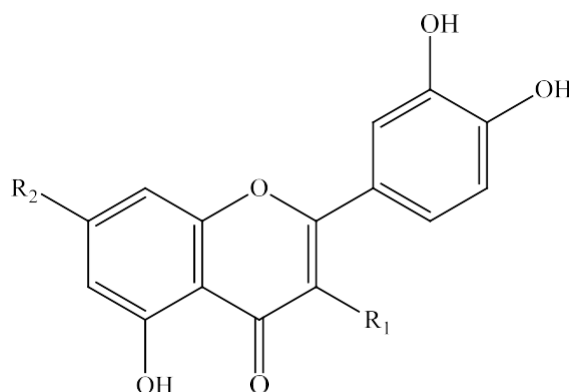
Flavonoïdes	Structure	Espèce	Référence
Quercétine 7-β- D Galactoside	<b>1</b>	<i>A. macrophylla</i>	[16]
Lutéoléine	<b>2</b>	<i>A. turbith subsp</i>	[14]
Lutéoline 7-O-β-D-glucoside	<b>3</b>		
Lutéoline 7- O- β-D-rutinoside	<b>4</b>		

**1:** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= O-β-D-Gal

**2:** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= OH

**3:** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= O-β-D-Glc

**4:** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= O-β-D-Rut

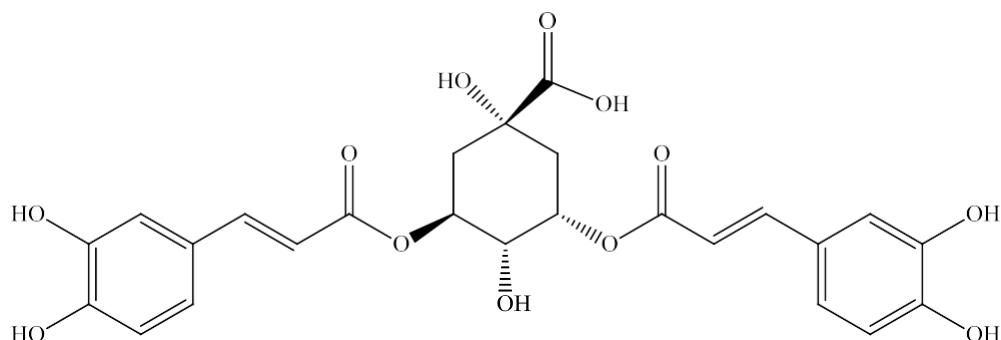


**Figure 6:** structures des flavonoïdes isolés du genre *Athamanta*

- Les acides gras:

**Tableau 3:** L'acide gras isolé du genre *Athamanta*

Acide gras	Espèce	Référence
3,5-di-acide O-caffeoylquinique	<i>A.turbith subsp</i>	[14]

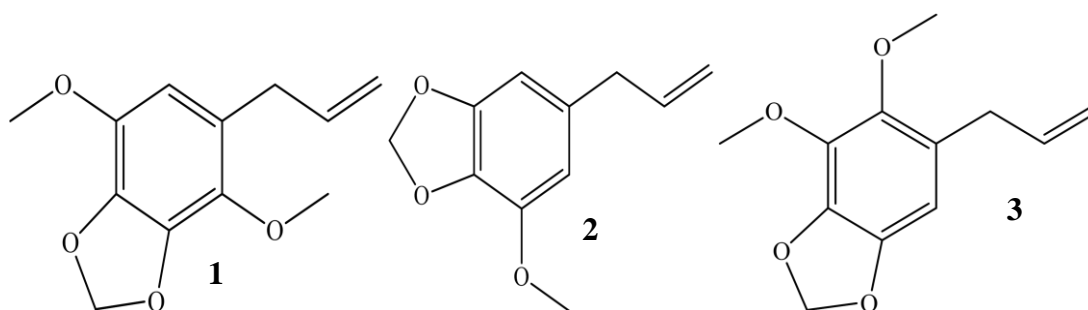


**Figure 7:** structure de l'acide gras isolé du genre *Athamanta*

- **Les phenylpropanoïdes:**

**Tableau 4:** Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Athamanta*

Phénylpropanoïdes	Structure	Espèce	Référence
Apiol	<b>1</b>	<i>A. Sicula L</i>	[17]
Myristicine	<b>2</b>		
Dillapiole	<b>3</b>		

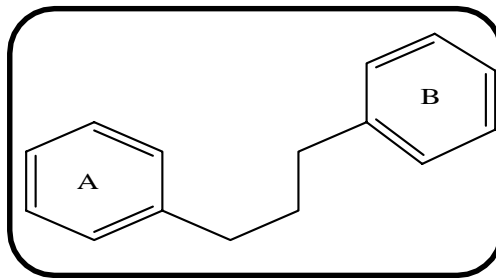


**Figure 8:** structures des phénylpropanoïdes isolés du genre *Athamanta*

## II. 1. Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes appartenant à la famille des polyphénols sont des composés phénoliques de nom latin flavus qui signifient jaune [18]

Ils possèdent ont tous la même squelette de base à 15 atomes de carbone contient 2 phényles (A et B) reliés par une chaîne en C3.



**Figure 9:** Squelette de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été réellement découverts par Albert, Ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation, ce sont des pigments responsable de la coloration des fleurs, fruits des légumes ,les boissons tels que le thé [19].

Ils s'en servent pour attirer les insectes pollinisateurs ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs [20].

Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres, Actuellement environ de 4000 composés flavoniques d'origine biosynthétique antivirale anti inflammatoire, anticancéreuse etc. [21].

Les flavonoïdes et ses dérivés sont stockés sous formes libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et ou dans la réticulum endoplasmique.

### II.1.1. classification des flavonoïdes :

Selon l'état structurale et le degré d'oxydation de l'hétérocycle centrale C .les flavonoïdes peuvent être répartis en plusieurs sous classe, les composés de la même classe sont déterminés par le point d'hydroxylation, ou d'autre substitution des noyaux A et B ils sont généralement solubles dans l'eau [22], la majorité des flavonoïdes naturels comportent des sucres, sont généralement glycosylés. L'hydro solubilité des flavonoïdes favoriser par la

présence des groupements hydroxyles et des sucres .les groupements méthyle et unités iso pentyles rendent les flavonoïdes lipophiles [23].

Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes :

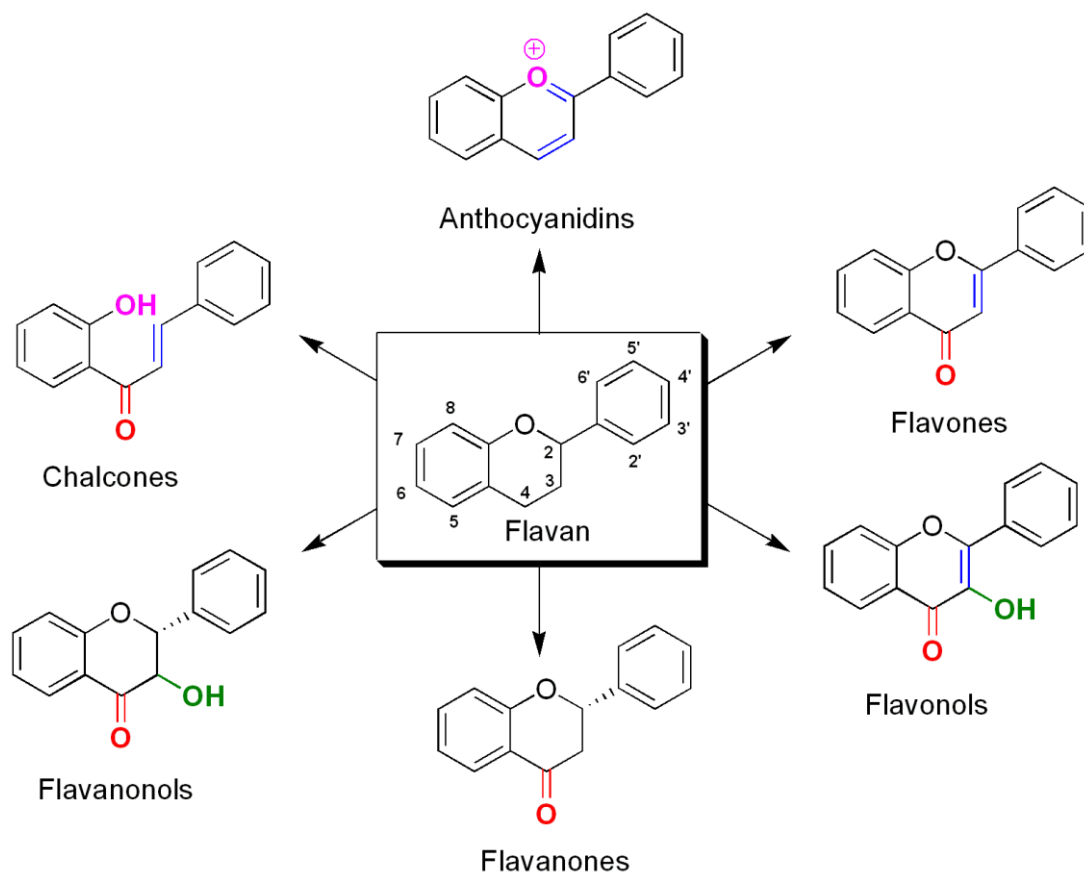


Figure 10 : Les différentes classes des flavonoïdes

**II.1.2. Propriétés des flavonoïdes :****II.1.2.1. L'activité antioxydante :**

Les flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes in-vitro, c'est-à-dire un pouvoir réducteur des espèces réactives oxygénées ou azotée produites en grande quantité dans des conditions inflammatoires qui accompagnent fréquemment le développement de pathologies chroniques par exemple (stress oxydant) [24].

La présence des fonctions hydroxyles phénoliques libres et les noyaux aromatiques riches en électrons leur confèrent ce caractère réducteur (donneur d'électron et de radical hydrogène) les flavonoïdes via leur catéchol, ont également la capacité de se complexer fortement avec les ions métalliques, en particulier les ions cuivre et fer dont le cycle catalytique redox est typiquement impliqué dans la production d'espèces réactives oxygénées [24].

En fin, les molécules flavonoïdiques montrent une affinité pour une large variété de protéines, ce qui leur confère un certain nombre de propriété biologique [25].

**II.1.2.2. L'activité antibactérienne des flavonoïdes:**

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonasaeruginosa*, chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes exemple: sur plusieurs bactéries testés l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensible à ces flavonoïdes, Au contraire la galantine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus*: les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule [26-27-28].

Les flavonoïdes sont capables de protéger les plantes des invasions microbiennes. Nombre de chercheurs se sont intéressés à mettre en évidence cette propriété des flavonoïdes chez l'être humain, les études ont une activité inhibitrice contre certains types de bactéries/virus.

### **II.1.3. L'étude phytochimique des flavonoïdes:**

#### **II.1 .3.1. Extraction des Flavonoïdes:**

Il existe différentes méthodes d'extraction des flavonoïdes sont [29]:

- Macération par solution hydro alcoolique (méthanol ou éthanol)
- Extraction successives de type liquide liquide par des solvants de polarité croissante.

Les solvants les plus utilisés sont : Ether de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol.

- Évaporation à sec des extraits obtenus.

#### **II.1.3.2. Séparation et purification des flavonoïdes**

##### **a. Séparation:**

La séparation des produits flavoniques se fait essentiellement par des méthodes chromatographiques Telles que :

- **La chromatographie sur Colonne (CC) :**

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme la cellulose ou le polyamide ou le gel de silice, et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélange importante et complexes [30].

- **La chromatographie préparatoire sur papier (CP):**

Basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont [31]:

- Acide acétique constitue le système aqueux



- Le *n*-butanol/acide acétique/Eau constitue le système organique

- **La chromatographie préparatoire sur couche mince (CCM):**

Très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification.

- b. Purification:**

Est un complément indispensable de la séparation elle consiste à éliminer les composés minoritaires, tels que les impuretés des solvants et des particules des substrats polyamide et sephadex entraînées lors de l'étape de séparation.

- colonne de polyamide
- colonne de sephadex
- contrôle de pureté par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

### **III.1. Les techniques d'identification structurale:**

L'identification des flavonoïdes se fait généralement (comme avec d'autres structures organique) par l'utilisation combinée des propriétés chromatographiques des flavonoïdes comme la fluorescence sous la lumière UV-visible et les valeurs de leurs  $R_f$  dans différents systèmes de solvants et les données de plusieurs techniques spectroscopiques [32], telles que la spectro photométrie UV-visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés ,et qui donne des indications importants sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que la spectrométrie de masse (SM) [33].

#### **III.1.1.Facteur de retardement et comportement chromatographique:**

Ce facteur symbolisé par  $R_f$  est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part [34].

$$R_f = \text{Distance parcourue par le composé} / \text{Distance parcourue par l'éluant} [35].$$

La valeur du  $R_f$  varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la polarité du produit

ainsi que de la disposition des différents substituants sur lesquelette flavonique [36].

Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$ :

**Tableau 5 :** la relation entre le  $R_f$  et la structure flavonique

<b>Structure flavonique</b>	<b><math>R_f</math></b>
Augmentation des groupes hydroxyles	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
Méthylation des hydroxyles	$R_f$ augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
Glycosylation	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux

### **III.1.2. La spectrophotométrie UV visible:**

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques, tous les flavonoïdes apparaissent sous UV sous forme de spots colorés, l'examen des flavonoïdes sous lumière UV 365 nm est très utilisé pour leur détection. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [37].

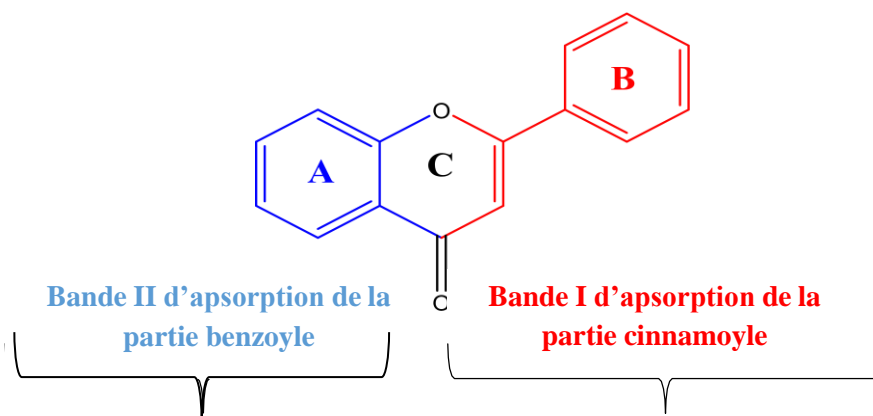


Figure 11 : Les deux parties benzoylé et cinnamoylé

✓ **La bande 1:**

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

✓ **La bande 2:**

Ayant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [38].

Le tableau 7 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelque type de flavonoïdes:

**Tableau 6:** l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes I et II en milieu méthanolique pour quelque type de flavonoïdes.

Type des flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Isoflavones	310-330	245-275
Flavanones et dihydroflavanols	300-330	275-295
Chalcones	340-390	230-370 faibles intensités
Aurones	380-430	230-370 faibles intensités
Anthocyanidinesanthocyanines	465-560	270-280

L'addition de divers réactifs au flavonoïde permet de localiser les substituant sur le squelette flavonique ou en général la présence d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'ondes). Pour une méthylation ou glycosylation des positions 3,5 et 4' hydroxylées, un déplacement hypsochrome est noté par la bande I.

✓ **Le spectre UV en présence des réactifs :**

Les réactifs souvent utilisés sont : NaOH, NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl, certains d'entre eux forment des complexes tels que AlCl<sub>3</sub> et NaOAc [39].

- **L'addition de AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl:**

L'addition de AlCl<sub>3</sub> à la solution du flavonoïde dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho, l'hydroxyle en 3 et le groupement carbonyle et l'hydroxyle en position 5 et le groupement carbonyle, ce qui entraîne un effet bathochrome de la bande I mais l'addition de HCl provoque la disparition des complexes instables et le maintien des complexes stables (hydroxyle et carbonyle).

Ceci se manifeste par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à celui en présence de AlCl<sub>3</sub> et bien évidemment un effet bathochrome moins important au spectre dans le méthanol, pris comme référence.

**- L'addition de NaOH:**

L'addition de NaOH indique la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement le OH de positions 4' par un effet bathochrome de la bande I.

**- L'addition de NaOAc et NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> :**

Le réactif NaOAc sert à détecter les groupements hydroxyles essentiellement celui de la position 7 par un léger effet bathochrome de la bande II, il ionise les OH les plus acides comme les hydroxyles des position 3, 7 et 4' [40]. Le tableau 8 donne les informations obtenues des spectres en présence des réactifs [39].

Le H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc et les informations apportées indiquent l'existence ou l'absence d'hydroxyle ortho sur le cycle B ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) à cause des complexes formés, l'effet qui se manifeste est un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre dans le méthanol [41].

**Tableau 7 :** Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des réactifs

Réactifs	Déplacement en nm		interprétation
	Bnde I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	<b>Flavone</b>
	352-385	250-280	<b>Flavonol(3-OH)</b>
	328-357	250-280	<b>Flavonol(3-OR)</b>
NaOH	+44 à +65		<b>OH en 4'</b>
	1. stabilité d'intensité /MeOH		<b>OR en 4'et OH en 3</b>
	2. diminution d'intensité		
	L'intensité diminue		<b>3',4 OH ou ortho di -OH</b>

	avec le temps (décomposition).		sur A ou ortho di-OH sur B
	Nouvelle bande /MeOH entre 320 à 335		OH en 7
NaOAc		+5 à + 20 Déplacement diminue- en présence d'un substituant en 6 ou 8	OH en 7
		Pas de déplacement ou très faible	OR en 7
		Spectre qui se décompose avec le temps.	5,6,7-tri OH ou 5,7,8- tri OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+12 à + 36		Ortho di OH sur B
AlCl <sub>3</sub>	Une seule bande entre 420- 430		Ortho di -OH sur B avec 5- OH
MeOH /AlCl <sub>3</sub> + HCl	+17 à + 20		5-OH avec une oxygénation en 6
	+35 à +55		5- OH et 3-OMe
	+50 à +60		OH en 3 avec ou sans OH en 5
AlCl <sub>3</sub> / (AlCl <sub>3</sub> +HCl)	-20 à -40 avec sommet ou épaulement entre (350- 360)		Ortho di OH sur B
	-20 à -25		Ortho di OH sur A et Ortho di OH sur B ou tri-OH sur B

### III.1.3. La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN):

C'est une méthode très précise et très efficace, trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques.

**III.1.3.1. La RMN du proton (RMN<sup>1</sup>H):**

Elle informe sur l'environnement des différents protons flavonique qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [42].

- 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.

**III.1.3.2. La RMN du carbone 13 (RMN<sup>13</sup>C) :**

Utiles pour mieux identifier la molécule par [42]:

- Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
- La connaissance de type des liaisons c-c et/ou c-o sucres.

**IV. Activité antioxydante:****IV.1. Définition:**

Le terme «antioxydant» a été formulé comme «une substance qui en faibles concentration, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels», les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, ou des agents de terminaison capables de dévier les radicaux libre, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires.

Les antioxydants neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libre, dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxique de ROS. Absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur [43].

Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non enzymatiques, endogènes ou exogènes [44].

- **Les antioxydants endogènes (enzymatiques) :**

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants: superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux, la quantité d'antioxydants endogènes diminué avec l'âge.

- **Les antioxydants exogènes (non enzymatique):**

Le glutathion, est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine c'est le plus important des défenses antioxydants en quantité et probablement en qualité.

- **Les radicaux libres :**

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, est une espèce chimique de demi vie très courte, le radical libre aura toujours remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il existe sous deux forme endogènes ou exogènes [45].

#### **IV.2. Principaux méthodes d'activité antioxydante:**

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs (métabolites secondaire) ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

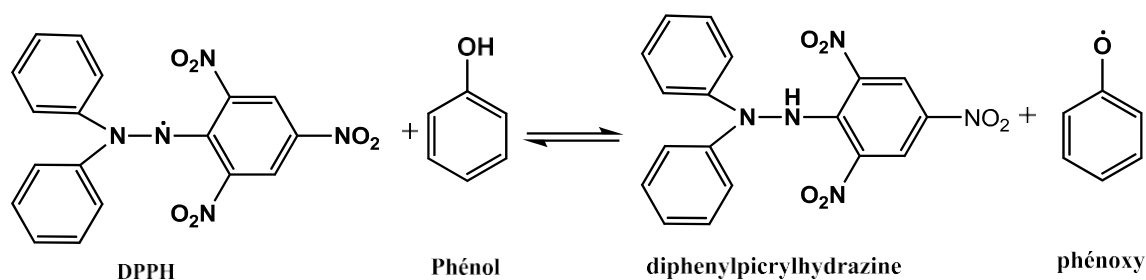
##### **IV.2.1. Inhibition du radical stable DPPH:**

C'est le test le plus ancien des tests indirects utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante, il peut déterminer le potentiel antioxydant des composés phénoliques individuels et de la nourriture et les échantillons d'intérêt biologique [46].

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (a,a-diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyle) c'est le radical libre stable fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure activité-antioxydant des composés phénolique [47,48].

La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux. D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

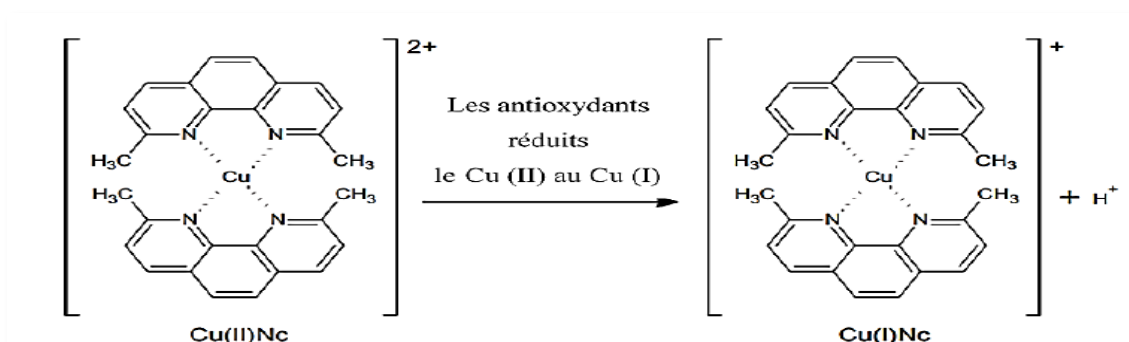




**Figure 12:** Réduction du DPPH par le phénol.

#### IV.2.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) :

C'est une méthode développée par **Apak** [49]. Le Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisée pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanines, ainsi que pour des thiols et les antioxydants synthétiques, les vitamines C et E [50].

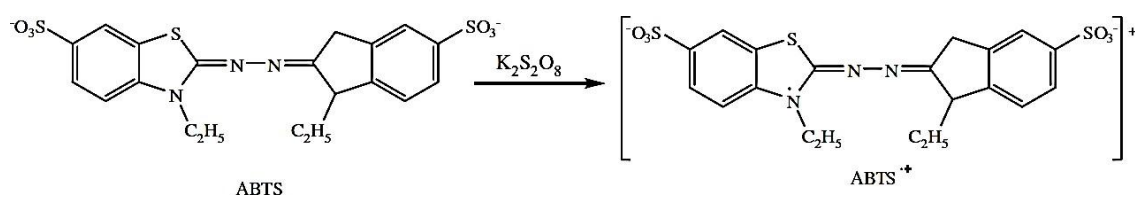


**Figure 13:** Réduction du complexe néocuproïne- cuivre.

Essentiellement utiliser pour la réduction de Cu II et par le traitement du Cu I avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9- diméthyle-1,10 phénanthroline) [51], former par la conversion des hydroxyles phénolique en quinones par la réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}\text{-NC}$ , produisant un complexe chromogène de  $\text{Cu}^{+2}\text{-NC}$  qui absorbe à 450 nm.

**IV.2.3. Test de la capacité du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>:**

l'ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthyl benzo thiazoline-6-sulfonique)) est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron [52].



**Figure 14:** Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de l'ABTS<sup>•+</sup>

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

## I. Etude phytochimique de la plante :

### I.1. Récolte du matériel végétal:

La plante a été récoltée dans la région de Constantine au mois de avril 2021 après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires la partie aérienne a été broyée et pesée (m=1,5 Kg).

### I.2. Extraction de la plante :

Une masse de 1,5 Kg de la matière végétale a été macérée à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/ H<sub>2</sub>O , 7/3 , v/v) pendant 24h. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration puis concentration, à une température n'excédant pas 40°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée.

Après un repos pendant 24h, la solution a subi une filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement des extractions liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées.



**Figure 15:** Les différentes étapes de macération, de filtration et d'évaporation de l'extrait hydroalcoolique d'une plante du genre *Athamanta*

Le tableau 9 présente les masses des extraits obtenues.

Tableau 8: Les masses des extraits obtenues après extraction liquide-liquide.

Extrait	Masse (g)
Dichlorométhane	1,82
Acétate d'éthyle	3,34
<i>n</i> -butanol	25,78

La figure suivante résume l'ensemble des opérations de l'extraction de la plante.

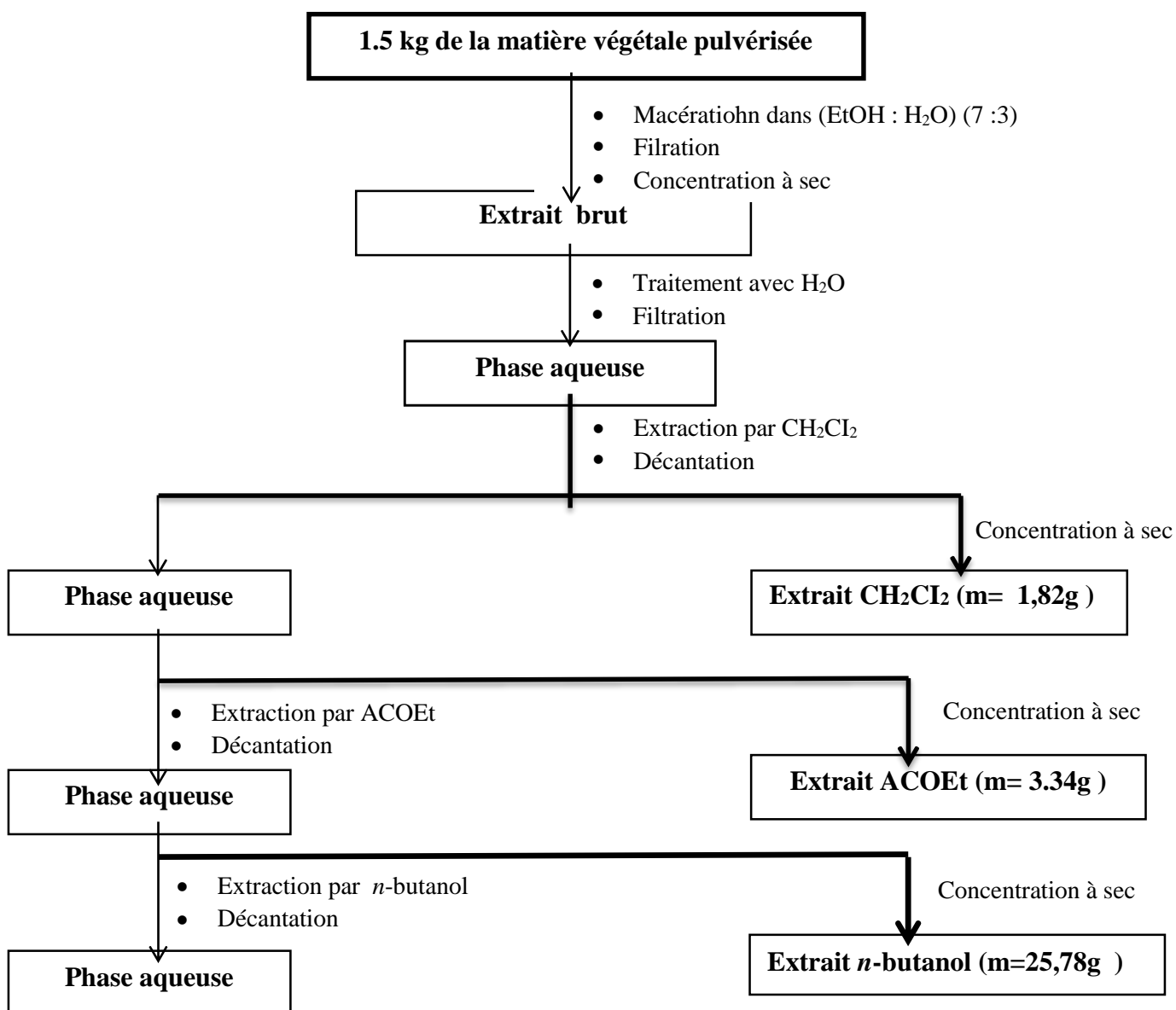
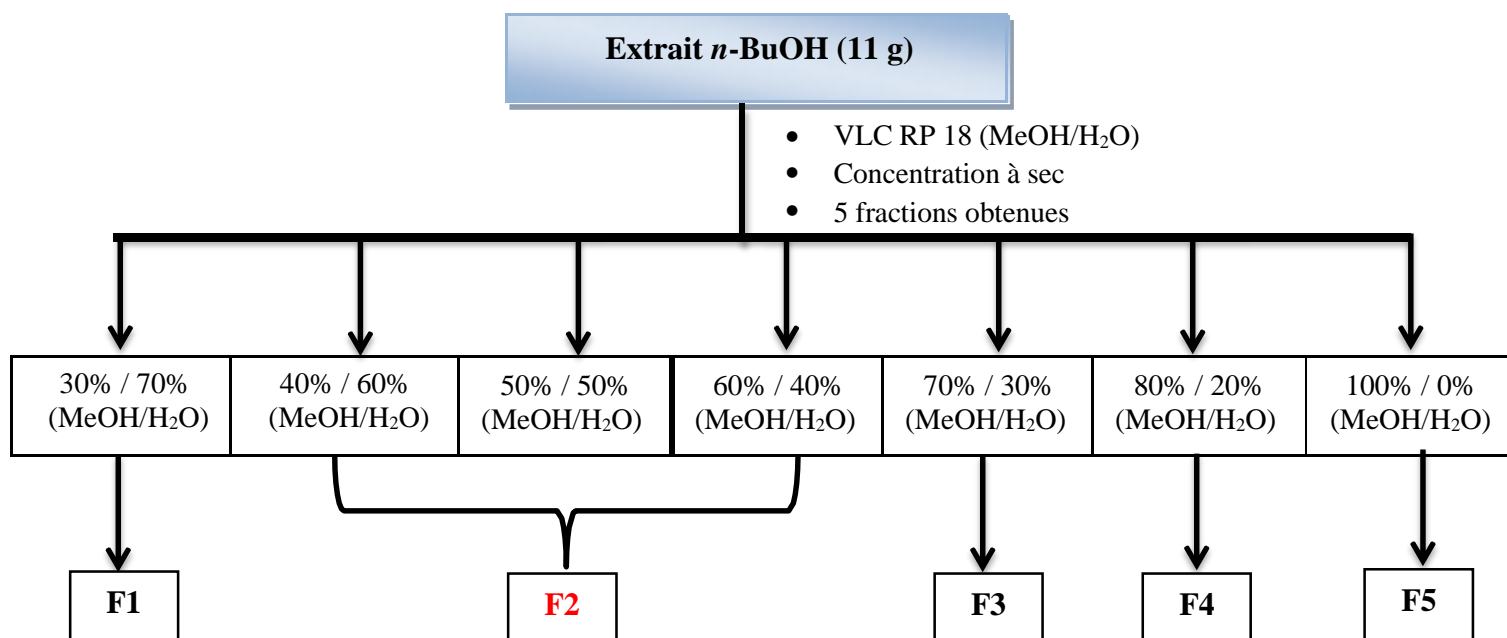


Figure 16: protocole d'extraction de l'espèce *Athamanta*.

### I.3. Séparation de l'extrait *n*-BuOH :

Les analyses par les plaques CCM ont montré la richesse de la phase *n*-BuOH en flavonoïdes, pour cela un premier fractionnement par VLC nous a semblé nécessaire pour faciliter les étapes suivantes de purification.

Une prise de la phase buthanolique (**11g**) a été soumise à un préfractionnement par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase inverse (RP18) éluée avec un gradient de MeOH:H<sub>2</sub>O (30 :70, 40 :60, 60 :40, 80 :20, 100 : 0), 3×250 mL chacun, des tests chromatographiques CCM ont été utilisés, afin d'évaluer la composition et la complexité de chaque fraction et pouvoir choisir les fraction à étudier, ce qui nous a permis de récupérer **5** fractions de polarité différentes, désignées **F1** à **F5** (Figure16).



**Figure 17:** schéma de fractionnement par VLC de la phase *n*-BuOH.

### I.4. Etude de la fraction F2 :

La fraction **F2** (**7.26 g**) a subi une séparation par une chromatographie sur colonne de polyamide préparé dans le toluène, l'éluion est réalisée avec un gradient de toluène-méthanol, commençant par le toluène pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive de méthanol.

Des fractions de 150 mL ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince avec les systèmes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) (9,5/0,5), (AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O)

(10/1/0.5),(14/1/0.5)(v/v), ces fractions sont visualisées sous la lampe UV (254-365 nm) et révélées dans un mélange d'acide sulfurique, d'acide acétique et de l'eau (4/80/16).



**Figure 18:** Chromatographie sur colonne de polyamide de la fraction **F2**.

Le suivi de cette séparation par la chromatographie sur colonne est reporté dans le tableau 10.

**Tableau 9:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-BuOH

LOT de fraction	Toluène (%)	MeOH (%)
<b>1-5</b>	100	0
<b>6-14</b>	98	2
<b>15-32</b>	95	5
<b>33-51</b>	90	10
<b>52-105</b>	85	15
<b>106- 125</b>	80	20
<b>126 -160</b>	75	30
<b>161-189</b>	70	35
<b>190-204</b>	60	40
<b>205-213</b>	0	100

Le Tableau 11 résume le regroupement final des fractions de la colonne à partir des résultats donnés par les plaques CCM qui sont éluées par les systèmes suivants :

- **Système 1 :** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) (9/1),(v/v)
- **Système 2 :** (AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O) (10/1/0.5),(12/1/0.5)(v/v)

Tableau 10: Résultats du regroupement final des fractions de la colonne

Lot de fraction	N° de Fraction	Observation
<b>1-11</b>	f1	Graisses et cires
<b>12-31</b>	f2	Mélange inséparable
<b>32-36</b>	f3	Précipité blanc
<b>37-61</b>	f4	Mélanges de produits (faible quantité)
<b>62-68</b>	<b>f5</b>	Mélange de produits falvoniques
<b>69-74</b>	f6	Mélange inséparable
<b>75-97</b>	f7	Mélange de produits
<b>98-109</b>	<b>f8</b>	Mélange de produits séparable
<b>110-144</b>	<b>f9</b>	Mélange de produits séparable
<b>145-164</b>	f10	complexe
<b>165-179</b>	f11	complexe
<b>180-196</b>	f12	complexe
<b>197-213</b>	f13	complexe




I.5. Etude de la sous fraction f5 :

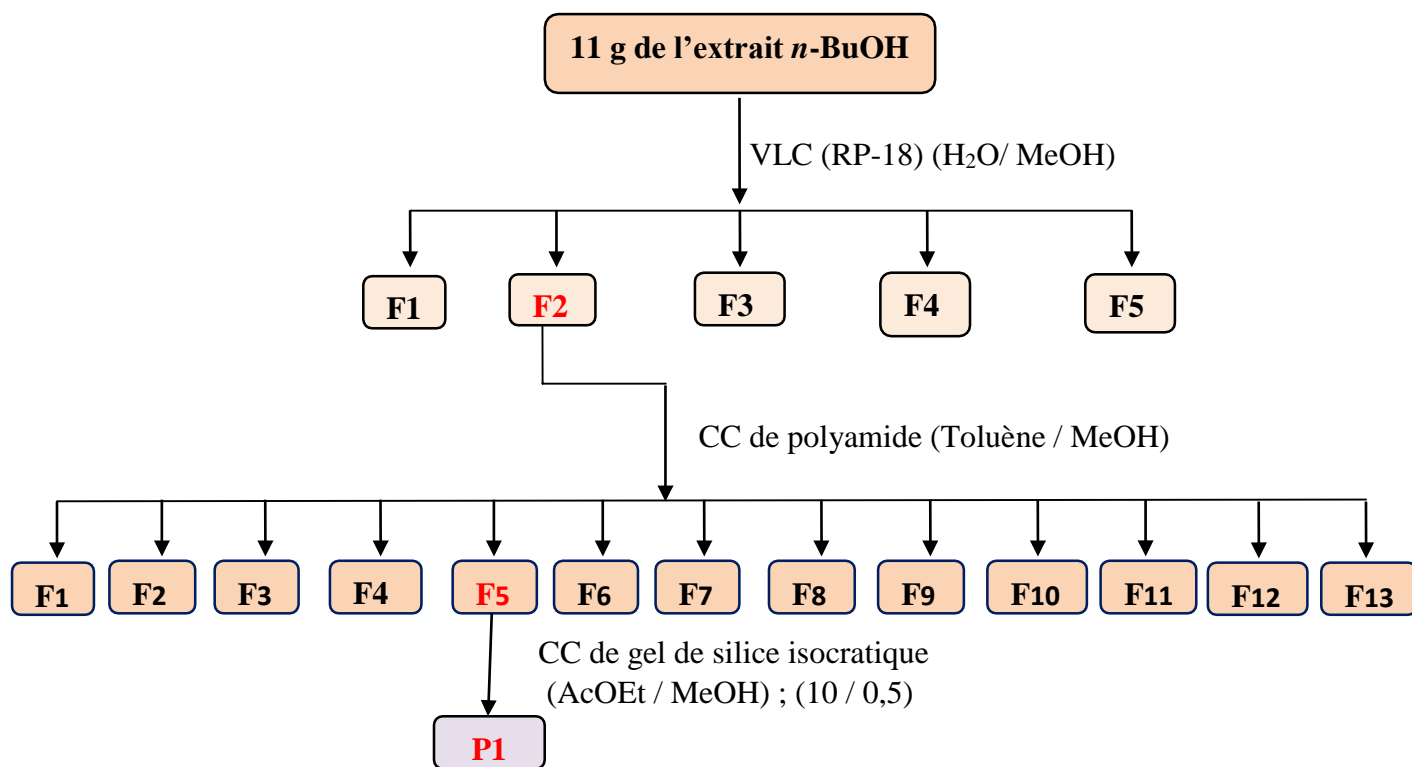
La sous fraction **f5 (188 mg)** a subi une deuxième séparation sur colonne isocratique de gel de silice en utilisant le système: AcOEt/MeOH (10 :0,5 ) v/v. Comme éluant.

Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions, sont présentés dans le tableau 12.

**Tableau 11:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction **f5**

<b>AcOEt/MeOH 10/0.5 Isocratique</b>	1-5	f5-1	Produits non flavoniques	
	6-8	<b>f5-2</b>	Produit pure ( <b>P1</b> )	
	9-13	f5-3	<b>P1</b> majeur	
	14-20	f5-4	Mélange	
	21-34	f-5	Mélange	

La figure 18 montre un schéma qui résume les étapes de séparation de l'extrait *n*-BuOH



**Figure 19:** schéma résume les différentes étapes de séparation de l'extrait *n*-BuOH

**II. Dosage des polyphénols:****II.1. Principe du dosage:**

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, fractions et sous-fraction sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu [53]. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption 765 nm. Pour cela, la détermination se fait spectrophotométriquement à cette longueur d'onde.

**II.2. Protocole expérimental**

- **Préparation de Carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7,5%**

7,5 g de  $Na_2CO_3$  sont dissouts dans 100 mL d'eau distillé.

- **Préparation de l'extrait de plante**

Une masse de 1 mg de chaque extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de Méthanol.

- **Préparation de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois**

2 mL de la solution FCR concentré (2M) est complété à 20 mL avec l'eau distillée.

- **Procédure :**

400  $\mu$ L d'extrait de plante est mélangé avec 2 mL de FCR dilué (1 :10) et de 1,5 mL de carbonate de sodium (7,5%). Après un repos de 2h à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

- **Gamme d'étalonnage**

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique :**

On prend 5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 25 mL de méthanol pour obtenir la solution S1 (0,2 mg/mL).

Les dilutions sont préparées dans des Eppendorfs comme suit:

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration de l'acide gallique ( $\mu\text{g/mL}$ )	25	50	75	100	125	150	175	200

- **Procédure :**

400  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont transférés dans un tube à essai et mélangés avec 2 mL FCR (1 :10) et de 1,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%). Après un repos 2h d'incubation à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 765 nm.

La teneur de polyphénols totaux, est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique est exprimée en mg équivalents d'acide gallique pour 1g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### III. Évaluation du pouvoir antioxydant :

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

L'activité antioxydante des extraits ethanologique, *n*-butanol et acétate d'éthyle a été testée par trois méthodes : DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$ , CUPRAC.

#### III.1. Protocole du test DPPH :

- **Principe :**

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH [54], le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

- **Préparation du DPPH :**

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 mL de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à  $T = -20^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière. L'absorbance est de 0,5 nm (490 nm) dans le spectrophotomètre.

- **Préparation des solutions mères de concentration 4 mg/ml**

On mélange 4 mg de chaque extrait, avec 1 mL de MeOH absolu dans un Eppendorf.

- **Procédure**

40 µL de différentes concentrations de chaque échantillon testé ont été déposés sur une microplaque à 96 puits, puis on ajoute à chaque puits, 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH. Le contrôle négatif (blanc) est préparé en parallèle, en mélangeant 40 µL du méthanol avec 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH. Après incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 490 nm en utilisant une lecture à microplaque.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (AA %) du radical DPPH selon la formule :

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

### **III.2. Protocole du test CUPRAC:**

- **Principe**

La réduction cuprique a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par **Apak** [55].

- **Préparation des solutions:**

- m = 0,7708 g d'Acétate d'ammonium (ACNH<sub>4</sub>) + 10 mL (H<sub>2</sub>O) → **S1** transparent (PH=7,0)
- m = 0,01705 g (Cu Cl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O) + 10 mL (H<sub>2</sub>O) → **S2** bleu
- m = 0,0156 g (Neocuprine) + 10 mL (EtOH) → **S3**

- **Procédure**

Dans chaque puits 200 µL, 40 µL d'extraits de chaque concentration, ont été ajoutés 60 µL de (S1), 50 µL de (S3) et 50 µL de (S2). Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, après 1h d'incubation l'absorbance est mesurée à 450 nm.

### **III.3. Protocole du test ABTS :**

- **Principe**

L'activité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> est effectuée selon la méthode de **Re** [56]. Le radical de l'ABTS<sup>•+</sup> est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en

présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert bleu. Le radical formé est stable.

- **Procédure**

L'ABTS<sup>•+</sup> a été produit par la réaction entre 19,2 mg (7 mM) ABTS avec 5 mL H<sub>2</sub>O et 3,3 mg (2,45 mM) de persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) avec 5 mL H<sub>2</sub>O, les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16h, l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H<sub>2</sub>O) à  $0,700 \pm 0,020$  à 625 nm avant l'usage. Ensuite, 160 µL de la solution de l'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 40 µL d'extrait à différentes concentrations après 10 min l'absorbance a été mesurée à 625 nm en utilisant un lecteur de microplaque à 96 puits.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (%) du radical ABTS par l'équation suivante :

$$AA(\%) = [1 - (A \text{ Extrait} / A \text{ blanc})] \times 100$$

# Chapitre III

## Résultats et discussion

**I. Identification du composé P1 :**

Le composé isolé a été identifié par les analyses spectrales, particulièrement l'RMN<sup>1</sup>H, l'UV- visible, sans négliger les autres caractéristiques physico-chimiques.

**I.1. Comportement chromatographique:****Tableau 12:** comportement chromatographique du composé **P1**

Système	S
<b>R<sub>f</sub></b>	<b>0,39</b>
<b>Fluorescence sous lumière de wood</b>	<b>violette</b>

S : (AcOEt/MeOH) (10/0.5), (v/v)

**I.2. Données spectroscopiques:****I.2.1. Données spectroscopiques UV-Visible :**

L'ensemble des données de la série spectrale UV-visible du composé **P1** est reporté dans le (tableau 14) qui résume les différents enregistrements des spectres effectués en présence d'une série des réactifs.

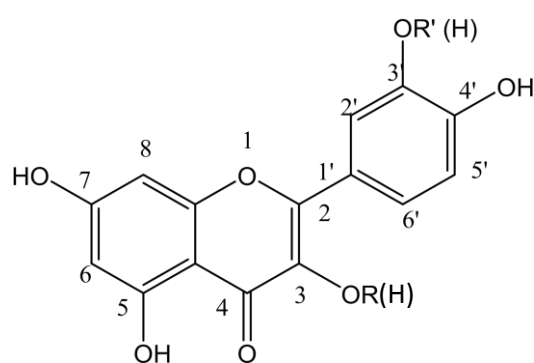
**Tableau 13 :** Données de la série spectrale UV-Visible du produit **P1**.

Réactifs	Bande I $\lambda_{\max}$ (nm)	Autres bandes $\lambda_{\max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{\max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	350	/	266	Flavone ou flavonol (3-OR)
NaOH	391	/	272	4'-OH
NaOAc	380	/	272	7-OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	353	/	265	Pas d'Ortho di-OH sur le noyau B
AlCl <sub>3</sub>	404	342	266	Pas d'Ortho di-OH sur le noyau B avec
AlCl <sub>3</sub> +HCl	400	340	273	5-OH

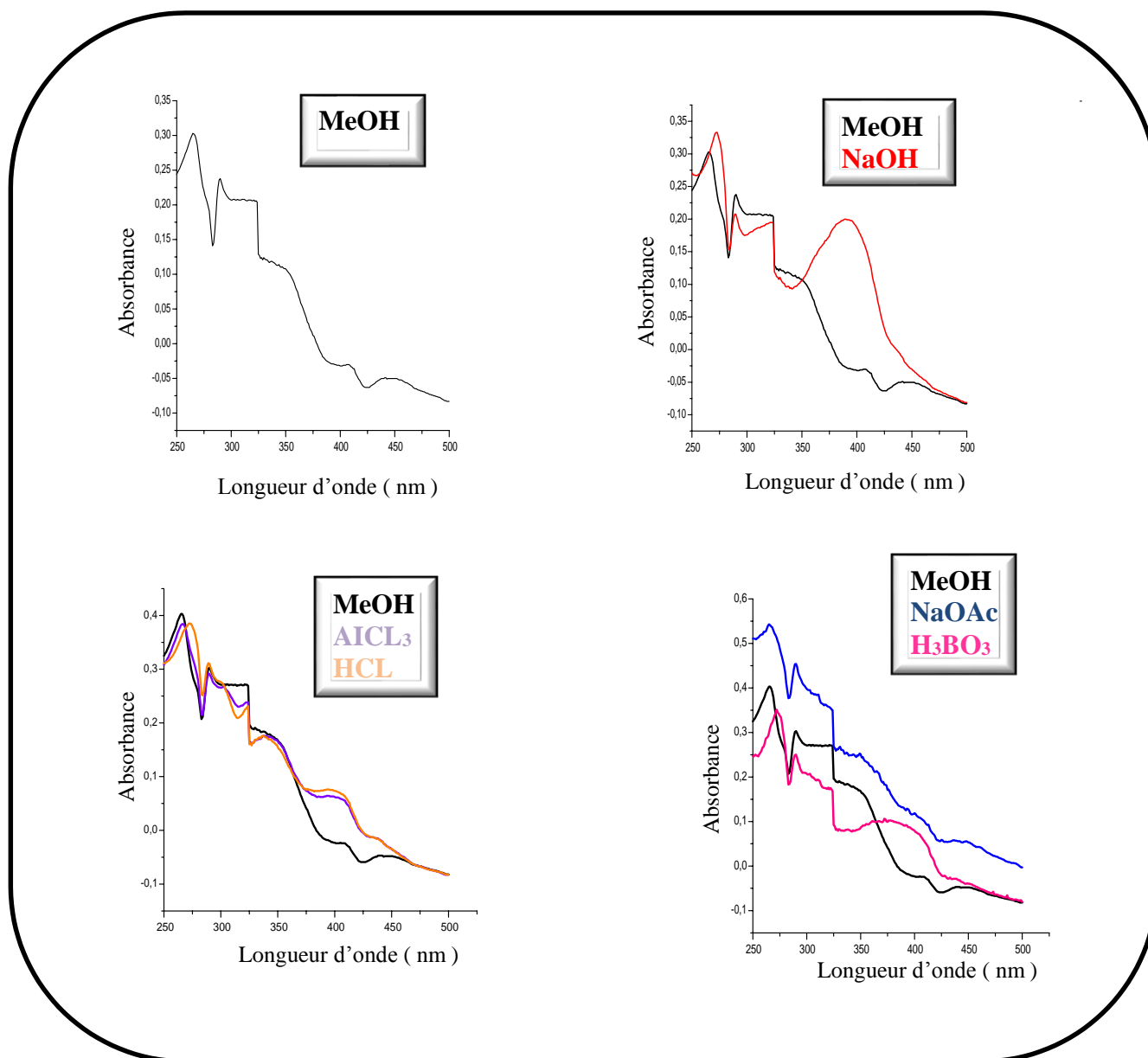
**Interprétation :**

- Le comportement chromatographique du composé **P1** dans le système utilisé et la fluorescence violette sous la lampe de wood, et la valeur  $\lambda_{\text{max}}$  de la bande I à **350 nm** du spectre UV enregistré dans le MeOH, indiquent que ce dernier est un flavonoïde de type flavone ou flavonol subsitué en 3.
- L'addition du réactif NaOH induit un effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 41\text{nm}$ ) avec une augmentation de l'intensité lumineuse, ceci indique la présence d'un OH libre en position 4'.
- Le spectre enregistré dans le méthanol en présence du réactif NaOAc, permet d'observer un effet bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = + 6\text{nm}$ ) indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ) induit un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 50 \text{ nm}$ ), indiquant la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 5.
- Le faible effet hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = - 4 \text{ nm}$ ), après l'addition de HCl au système ( $\text{MeOH}+\text{AlCl}_3$ ) indique l'absence d'un système ortho di-OH sur le noyau B. Ceci est confirmé par le faible déplacement bathochrome de la bande **I** ( $\Delta\lambda = +3\text{nm}$ ) en comparant le spectre ( $\text{MeOH}+\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ ) avec le spectre enregistré dans le MeOH (figure19).

Ces données nous permettent de proposer la structure probable suivante pour le produit **P1** :







**Figure 20:** série spectrale UV –Visible du composé **P1**.

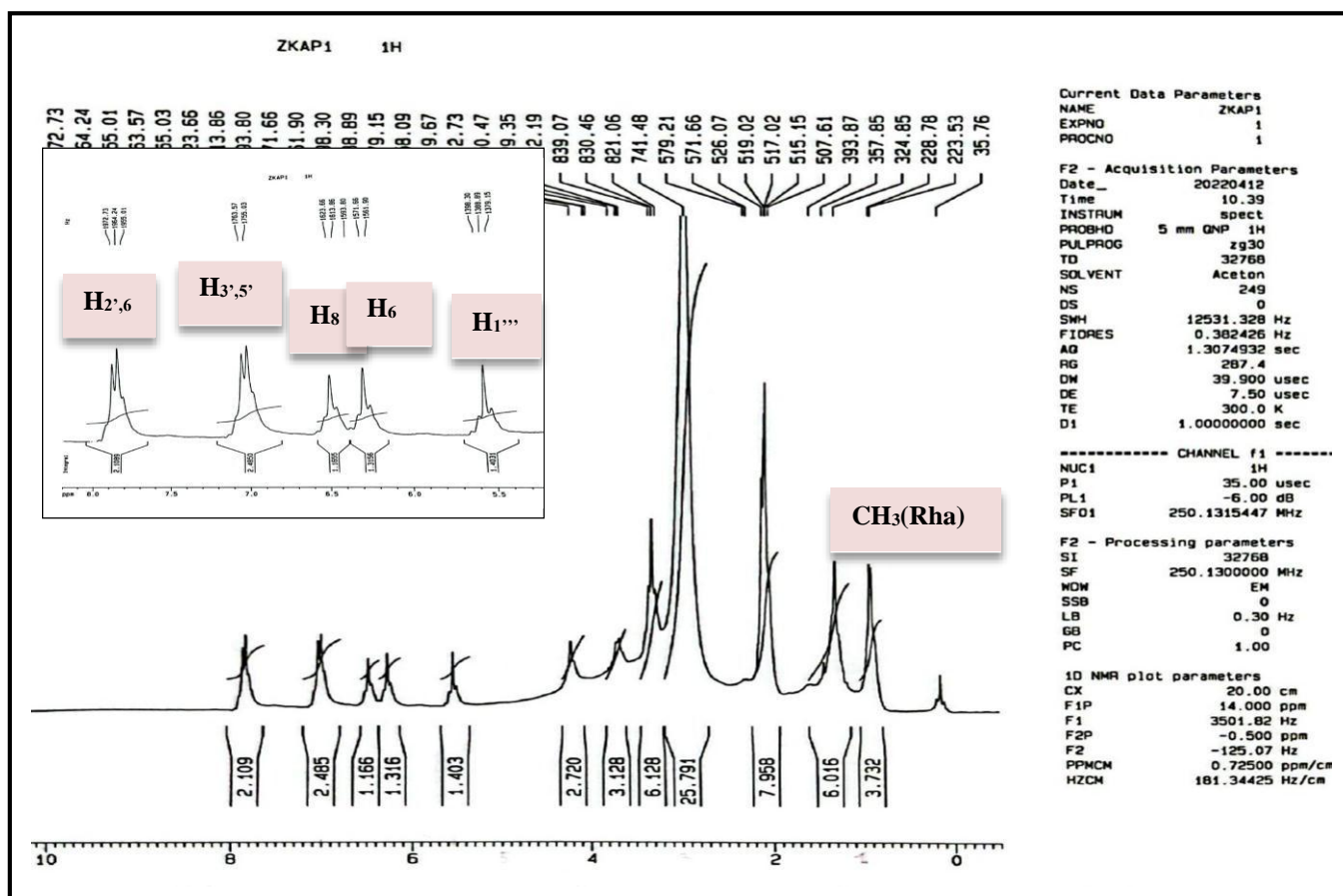
I.2.2 . Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H :Tableau 14: Données spectroscopiques RMN<sup>1</sup>H (250 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) du P1

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage <i>J</i> (Hz)	Attribution
7.86	2H	d	8.5	H <sub>2',6'</sub>
6.75	2H	d	8.5	H <sub>3',5'</sub>
6.37	1H	s.l	-	H <sub>8</sub>
6.24	1H	s.l	-	H <sub>6</sub>
5.53	1H	s.l	-	H <sub>1''</sub> rha
0.90	3H	d	5.3	CH <sub>3</sub> (rha)
3-4	-	-	-	Protons de sucre

**Interprétation :**

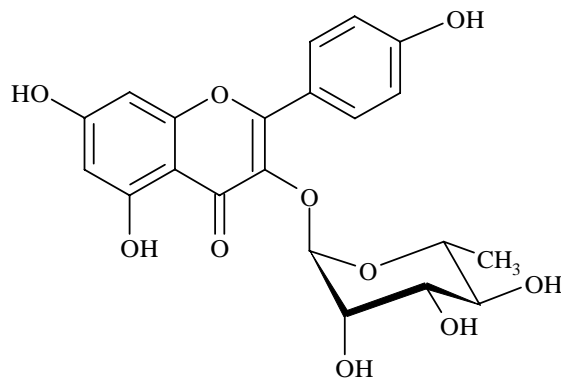
Le spectre RMN<sup>1</sup>H montre les signaux caractéristiques d'un flavonol (3-OR) , apparaissant comme suit:

- Deux signaux sous forme d'un doublet d'intégration 2H à  $\delta = 7,86$  ppm et  $\delta = 6,75$  ppm avec une constante de couplage  $J = 8,5$  Hz (un couplage ortho) attribuable successivement aux protons H<sub>2',6'</sub> et H<sub>3',5'</sub>.
- Deux singlets larges apparaissent à  $\delta = 6,37$  ppm et à  $\delta = 6,24$  ppm d'intégration 1H, attribués respectivement à H<sub>8</sub> et H<sub>6</sub>.
- L'apparition d'un singlet large à  $\delta = 5,53$  ppm d'intégration 1H caractéristique d'un proton anomérique du sucre Rhamnose H<sub>1''</sub> confirmé par l'apparition de son méthyle sous forme d'un doublet à  $\delta = 0,90$  ppm avec une constante de couplage  $J = 5,3$  Hz.
- Dans l'intervalle [3-4] ppm, se trouvent les autres protons du rhamnose.



**Figure 21:** Spectre RMN<sup>1</sup>H (250MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) du produit **P1**.

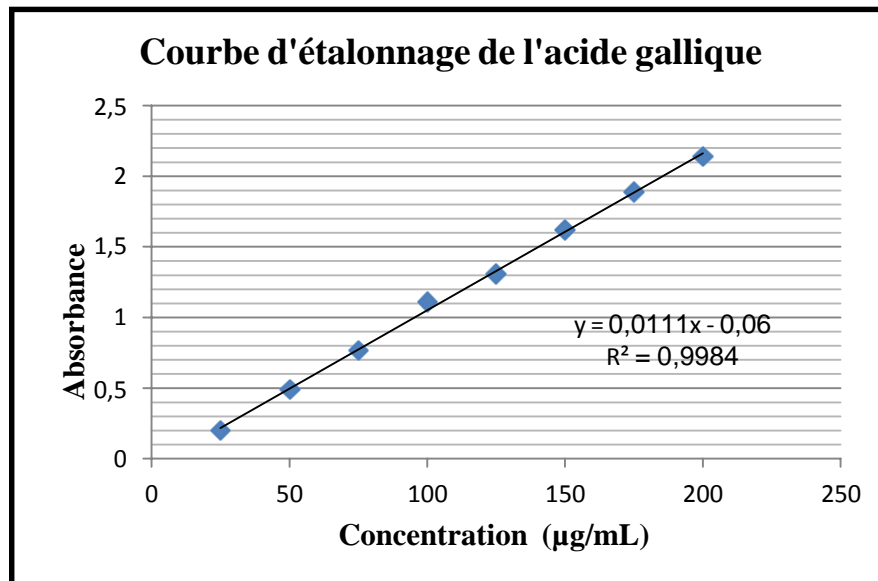
Ces données nous permettent d'identifier la structure finale du produit **P1**.



**Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside**

## II. Dosage des composés phénoliques:

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 21:



**Figure 22:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les valeurs de la densité optique (DO) mesurées des échantillons et la quantité des composés polyphénoliques sont mentionnées dans le tableau 16.

**Tableau 15:** La densité optique (DO) mesurée et la quantité des composés polyphénoliques calculé des trois extraits.

Extraits	DO (nm)	Quantité des polyphénols en (µg EAG/mg) d'extrait
EtOH	0,254	28,28
BuOH	0,465	47,29
ACOEt	0,575	57,21
Extrait hydro-éthanolique de thé vert	-	313,3

La quantité des composés polyphénoliques indiqué dans le tableau 16 est calculé selon la relation suivante:

$$Y = 0,011 X - 0,06$$

Les résultats indiquent que la richesse de l'extrait acétate d'éthyle en polyphénols est plus importante que les autres extraits, cette quantité est faible comparé à celle des polyphénols trouvés dans l'extrait de thé vert (313.3) [57].

### III . Activité antioxydante:

L'activité antioxydante des trois extraits EtOH, BuOH et ACOEt a été évalué par trois méthodes DPPH, CUPRAC et ABTS.

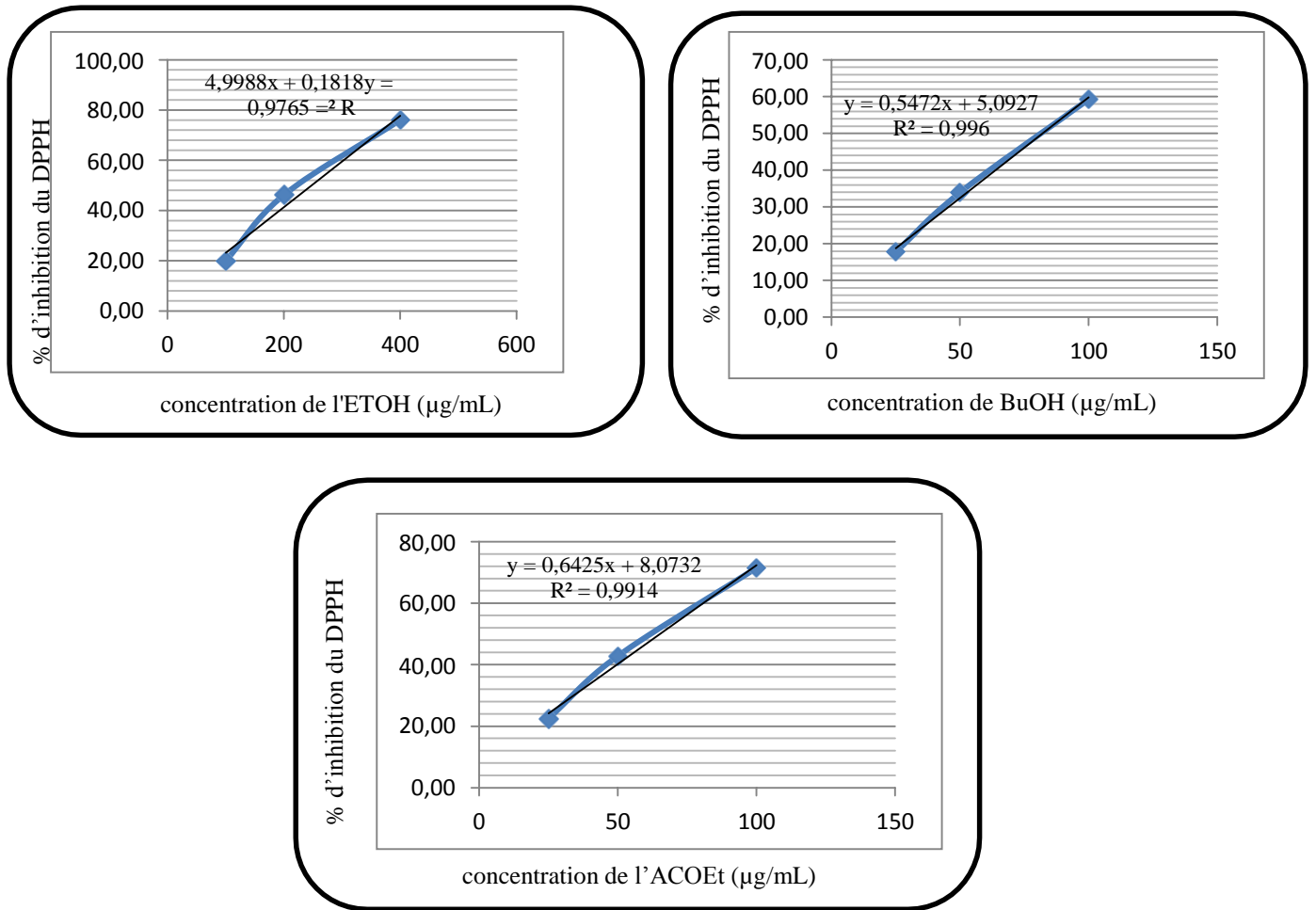
#### III.1. Test du DPPH:

Selon les mesures effectuées sur les extraits, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de DPPH. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 17.

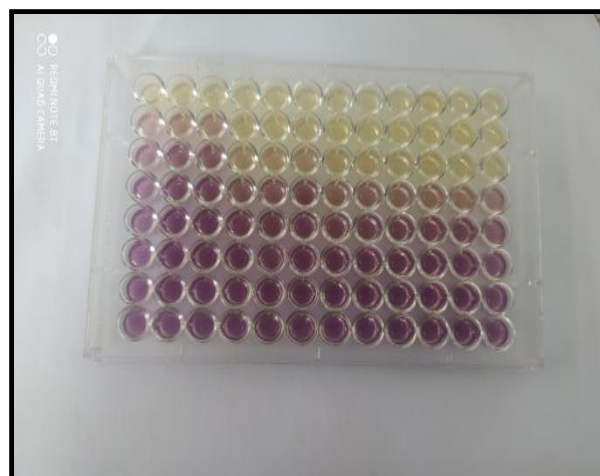
**Tableau 16:** Pourcentage d'inhibition du DPPH par les trois extraits EtOH, BuOH et ACOEt.

Extrait	Pourcentage d 'inhibition du DPPH %							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
Extrait EtOH	76 ,11±1,55	46,26±0,86	19,92±1,54	11 ,38±2,54	6,17±1,65	1,06±1,17	0,31±1,12	247,72±4,87
Extrait BuOH	78,46±0,98	75,50±1,39	59,31±1,83	33,96±0,49	17,77±1 ,96	14,95±7,74	5,70±5,10	82,02±5,91
Extrait ACOEt	81,13±0,37	79,72±0,61	71,46±1 ,58	42,78±1 ,45	22,41±2,33	11,95±1,33	5,05±1,38	65,30±1,87
BHA								2,23±0,61

La détermination de la CI<sub>50</sub> se fait à partir des graphes suivants (figure 22):



**Figure 23:** Courbes de pourcentage d'inhibition du DPPH par les trois extraits EtOH, BuOH et ACOEt.



**Figure 24:** Photo prise lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.

La concentration correspondante à 50 % d'inhibition est calculée selon les équations des trois graphes suivantes:

$$y = 0,1818x + 4,9988$$

$$y = 0,5472x + 5,0927$$

$$y = 0,6425x + 8,0732$$

Pour  $y = 50\%$ , la  $CI_{50}$  sera calculée comme suit :

- **Extrait ETOH:**

$$X = (50 - 4,9988) / 0,1818 = 247,53 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 247,53 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait BUOH:**

$$X = (50 - 5,0927) / 0,5472 = 82,07 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 82,07 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait ACOEt:**

$$X = (50 - 8,0732) / 0,6425 = 65,26 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 65,26 \mu\text{g/mL}$$

Parmi les trois extraits, les deux extraits *n*-BuOH et ACOEt sont plus actifs avec une  $CI_{50}$  de 82,07 et 65,26  $\mu\text{g/mL}$ , par contre l'extrait ETOH montre une activité modérée avec une  $CI_{50}$  de 247,53  $\mu\text{g/mL}$ .

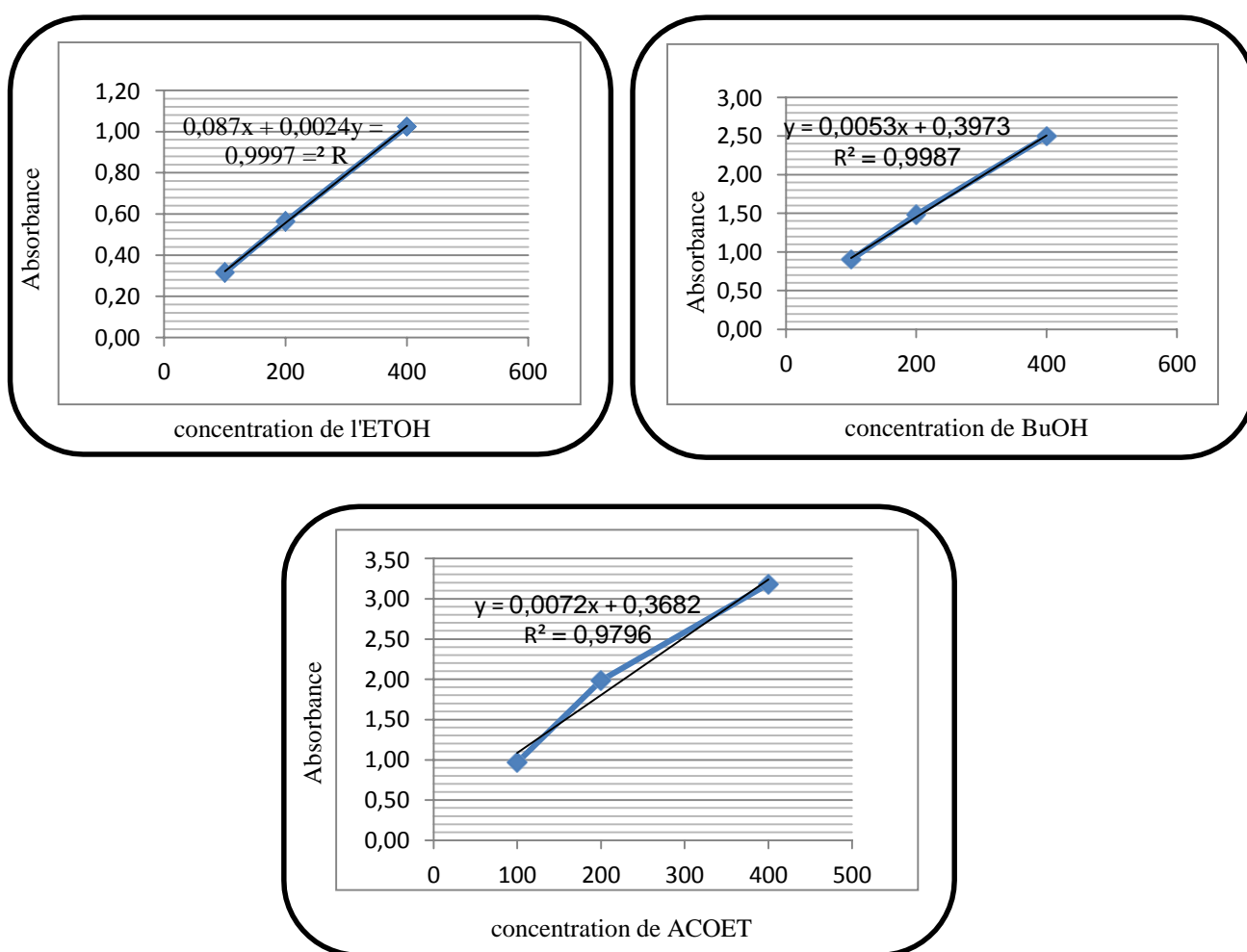
### III.2-Test du CUPRAC:

selon les mesures effectuées sur les extraits EtOH ,BuOH et ACOEt, nous avons calculé l'absorbance de l'activité antioxydante de CUPRAC. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18.

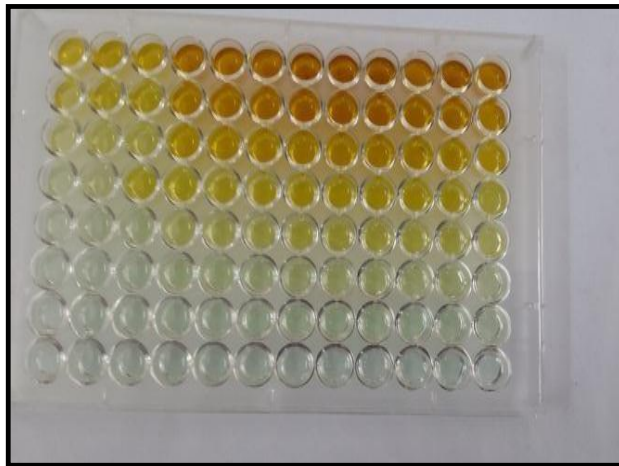
**Tableau 17:** L'absorbance de l'activité antioxydante des extraits EtOH, *n*-BuOH et ACOEt au CUPRAC .

Extrait	Absorbance							A0.50 (µg/ml)
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
Extrait EtOH	1,02±0,05	0,56±0,04	0,32±0,00	0,23±0,01	0,18±0,00	0,15±0,00	0,13±0,00	172,10±3 ,97
Extrait BuOH	2,50±0,13	1,49±0,17	0,90±0,03	0 ,47±0 ,02	0,30±0,02	0 ,20±0,00	0,15±0,00	19,42±12,12
Extrait ACOEt	3,18±0,13	1,98±0,05	0,97±0,01	0,56±0,00	0,34±0,01	0 ,22±0,01	0,17±0,01	18,70±2,15
BHA								6,46±0,22

La détermination de l'A<sub>0.5</sub> se fait à partir des graphes suivants (figure 24):

**Figure 25:** Courbes de l'activité antioxydante au CUPRAC par les trois extraits





**Figure 26:** Photo prise lors du dosage de l'activité CUPRA

L'absorbance correspondante à 0.50 de l'activité antioxydante est calculée selon les équations des trois graphes suivantes:

$$Y = 0.0024x + 0.087$$

$$y = 0.0053x + 0.3973$$

$$y = 0.0072x + 0.3682$$

Pour  $y = 0.50$ , l' $A_{0.50}$  sera calculée comme suit :

- **Extrait ETOH :**

$$X = (0.50 - 0.087) / 0.0024 = 172,08 \mu\text{g/mL}$$

$$A_{0.50} = 172,08 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait BUOH :**

$$X = (0.50 - 0.3973) / 0.0053 = 19,38 \mu\text{g/mL}$$

$$A_{0.50} = 19,38 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait ACOEt :**

$$X = (0.50 - 0.3682) / 0.0072 = 18.3 \mu\text{g/mL}$$

$$A_{0.50} = 18.3 \mu\text{g/mL}$$

Les résultats du test au CUPRAC obtenus ont révélé que les deux extraits *n*-BuOH et ACOEt sont plus actifs que l'extrait EtOH, ont manifesté une bonne activité inhibitrice du CUPRAC ( $A_{0.50} = 19,38$ ,  $A_{0.50} = 18,3 \mu\text{g/mL}$ ) en les comparant avec l'extrait EtOH, cependant cette dernière est modérée par rapport aux standard BHA ( $A_{0.50} = 6,46 \mu\text{g/mL}$ ).

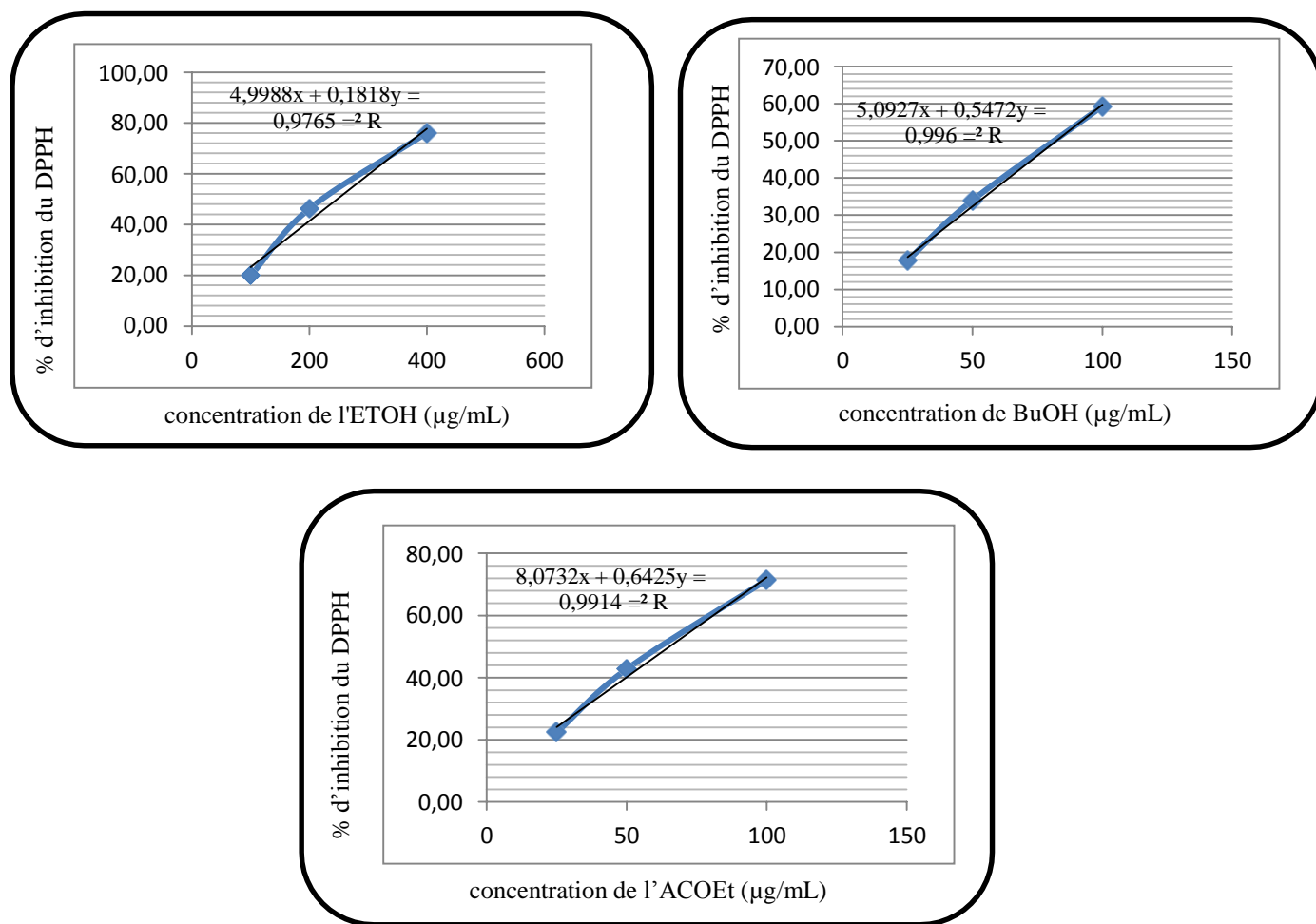
**Tableau 18** : les pourcentages d'inhibition de l'ABTS par les extraits EtOH, *n*-BuOH et ACOEt

Extrait	Pourcentage d'inhibition de l'ABTS %							CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
<b>Extrait EtOH</b>	87,88 $\pm$ 2,22	86,69 $\pm$ 6,17	51,25 $\pm$ 3,39	33,69 $\pm$ 2,49	15,06 $\pm$ 11,44	10,06 $\pm$ 4,50	-3,38 $\pm$ 3,38	96,88 $\pm$ 5,64
<b>Extrait BuOH</b>	89,19 $\pm$ 2,20	90,88 $\pm$ 0,76	90,06 $\pm$ 1,60	85,06 $\pm$ 6,39	41,38 $\pm$ 1,88	25,06 $\pm$ 6,71	6,44 $\pm$ 2,65	28,26 $\pm$ 3,71
<b>Extrait ACOEt</b>	90,38 $\pm$ 0,60	90,81 $\pm$ 0,50	90,94 $\pm$ 0,92	89,56 $\pm$ 2,49	66,56 $\pm$ 4,59	38,25 $\pm$ 4,18	28,81 $\pm$ 3,46	17,31 $\pm$ 1,19
<b>BHA</b>								1,81 $\pm$ 0,10

### III.3-Test de l'ABTS:

Selon les mesures effectuées sur les extraits, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de l'ABTS. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 19.

La détermination de la CI<sub>50</sub> se fait à partir des graphes suivants (figure 26):



**Figure 27:** les courbes de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les trois extraits



**Figure 28:** Photo prise lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS

La concentration correspondante à 50 % d'inhibition est calculée selon les équations des trois graphes suivante:

$$y = 0.3535x + 15.969$$

$$y = 1.6211x + 3.2188$$

$$y = 2.0493x + 14.656$$

pour  $y = 50\%$  , la  $CI_{50}$  sera calculée comme suit :

- **Extrait ETOH :**

$$X = (50 - 15.969) / 0.3535 = 96.26 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 96.26 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait BUOH :**

$$X = (50 - 3.2188) / 1.6211 = 28.86 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 28.86 \mu\text{g/mL}$$

- **Extrait ACOEt :**

$$X = (50 - 14.656) / 2.0493 = 17.25 \mu\text{g/mL}$$

$$CI_{50} = 17.25 \mu\text{g/mL}$$

Les trois extraits testés, EtOH, *n*-BuOH et ACOEt ont montré une activité modérée inhibitrice du radical  $ABTS^{++}$  avec une  $CI_{50}$  de 96,88, 28,26 et 17,31  $\mu\text{g/mL}$  successivement.

### **Conclusion:**

En conclusion de ces résultats, les deux extraits *n*-BuOH et ACOEt ont montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait EtOH par les trois méthodes antiradicalaires au DPPH, CUPRAC et ABTS.

- [1] Inserin, P., Masson, M., Restellini, j. P., Ybert, E., Laage Meux, A., Moulard, F. (2001). La rousse encyclopédie des plantes médicinales identification, préparation, soins. 21 rue de Montparnasse 75283 Paris, 2<sup>ème</sup> édition, P250.
- [2] Hamidi, A. (2013). Etude de l'activité antibactérienne des huiles. Mémoire de magister. Université de Biskra.
- [3] Ouis, N. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil thèse de doctorat. Université d'Oran. P 16-18.
- [4] Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Can Baser, K-H., Bedir, E., Khan, I-A., Wedge, D-E. 2006. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A*, 1117, 194–205.
- [5] Cronquist, A., Takhtadzhian, A.L. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. 1262pp.
- [6] Anthony R. Magee & al., (2010). New tribal delimitations for the early diverging lineages of Apiaceae subfamily Apioideae, *Taxon*, 59, 2, p.567.
- [7] Heywood, V.H., Moore, D.M., Richardson, I.B.K., Stearn, W.T. (1996). Les plantes à fleurs 306 familles de la flore mondiale. 218-219.
- [8] Dupont, F., Guignard, J-L. 2007. Botanique systématique moléculaire. 14<sup>e</sup> édition révisée. Elsevier Masson SAS, 238-243.
- [9] Tomic, A., Petrovic, S., Pucarevic, M., Sobajic, S., Ristic, M., & Niketic, M. (2006). Fatty acid composition of two *Athamanta turbit* subspecies. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(4), 391–393.
- [10] Petrovic, G-M., Stamenkovic, J-G., Mitic, V-D., Stojanovic, G-S., Zlatkovic, B-K., Jovanovic, O-C. (2018). Chemical Composition and Antioxidant Activity of the *Athamanta turbit* ssp. *haynaldii* Volatiles. *Natural Product Communications*, 13(6), 1934578X1801300634.
- [11] Camarda, L., Di Stefano, V., Pitonzo, R. (2008). Chemical Composition of Essential Oils from *Athamanta sicula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(4), 532–533.
- [12] Tela Botanica ( France métró [archive]) : *Athamanta* L. [archive].
- [13] NCBI : *Athamanta* [archive] ( taxons inclus [archive]).

## Références bibliographiques

---

- [14] Tomic, A., Petrovic ,S, Pavlovic , M, T Zakou , o, couladis , M , Milenkovic ,M , vucicevic , D , lakusic , B .(2009) . Composition and antimicrobial activity of the rhizome essential oils of two *Athamanta turbith* subspecies, journal of essential oil Research, 21(3),276-279.
- [15] Di Stefano, V., Pitonzo, R., Schillaci, D. (2011). Antimicrobial and antiproliferative activity of *Athamanta sicula* L. (Apiaceae).Pharmacognosy Magazine, 7(25), 31-34.
- [16] Kamilov, Kh -M., Nikonov, G- K. (1971). Chemistry Study of *Athamanta macrophylla* fruits khimiya prirodnykh Soedinenii. (5), 633-4.
- [17] Camarda , Lorenzo ; Distefano , vita . Journal of essentiel oil Research (2003) ,15 (2) ,133-134.
- [18] Duval ,C ,R ,Duval. (1978). Dictionnaire de la chimie et de ses Applications. Édition Tec &Doc ,la voisier , Paris .
- [19] Tsimogiannins D , I, Oreopoulou V .(2006). The contribution of flavonoid C-rignon DPPH free rodical seavenging efficiency. Akinetic approche for the 3' , 4' – hydroxy substituted members . Innovative food science and Emerging Technologies , 7 : 140-146.
- [20] Harbrorne, J. B., Smith, D. M. (1978) . Anthochlor and other flavonoids as honey guides in the compositae . Biochemical systematics and Ecology. 6 (4), 287-291.
- [21] Edenharder R., Grunhage D., (2003). Free rodical Seavenging abilities of flavonoïds as méchanism of protection again smutagenicity induced by tert-butylhydro peroxide or. Cumen hydroperoxide in salmonella\_typhimurium TA102.
- [22] Verpoorter , R. Alfermannv A . W. (2000). Metabolic. Emgineering of plant secondary Metabolism , Ed : kluwer Academic 1-23 et stockés les vacuoles et dans les chloroplastes
- [23] Crozier, A. Clifford M., N. Ashihara H. (2006). Plant secondary Metabolites , Ed : oxford Blackwell . 1-24, 102 – 105 .
- [24] Dangles, O; Du four, C. Flavonoïd–protein Binding processes and their potentiel Impact on Human Health Recent Advances in polyphenol Research ; wiley \_ Black well : oxford,UK (2009),PP6 7 \_ 87.
- [25] Hovsteen , B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoïds . pharmacol .Ther , 96 ,67 \_202.
- [26] Stavric, B. Matula T. I . (1992) . Flavonoïds in food. Their significance for nutrition and health : 274 \_ 294.
- [27] Dos, H. C., Wang. J . H et lien . E . J . (1994) .carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure \_ système \_activity relation ship (SSAR) analysis

## *Références bibliographiques*

---

133\_136.

- [28] Bidet, D. Gagnault J. C., Girard Pet. Trotin F. (1987). Inflammation, allergie, douleurs et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : les flavonoïdes. L'actualité chimique .89 \_ 97.
- [29] Bruneton. J., (1999). pharmacognosie , phytochimie , plantes médicinales. Lavoisier . Technique & Documentation. Paris .
- [30] Markham k. R., (1982). techniques of flavonoïdes identification, Academic Press,London.
- [31] Mabry T . J., Markham K . R . , thomas M . B . , (1970). The systematic identification of flavonoïds. Springer -verlag. New york , Heide pberg. 254.
- [32] Tieppo , I . V . , Dias , A . S . S . , Sildasaz , M . F . , Silveira , T . R., Marroni , C . A., Marrpni, N. P. Henriques, J. A. P. picada, J. N. (2007). Food and chemical Toxicology . 45, 1140 -1146.
- [33] Jurd, L. Horowit Z, R. (1962). Spectral.properties of flavonoïdes compounds, pergamon presse oxford, 107, 2055.
- [34] Markham K , R . , (1982). Techniques of flavonoïds identification, Academic press , London.
- [35] Mabry T. J., Markham K\_ R., thomas M. B., (1970). The systematic identification of flavonoïds. Sprinyer \_ verlog New york . Heidelberg. 254.
- [36] Berthillier A . , 1972 . la chromatographie et ses applications, Dunod Paris.
- [37] Mabry, T. J., K. R. MarKham, M. B. Thomas, (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-verlag New york, Heidelberg. 254.
- [38] Berthillier, A. (1972). La chromatographie et ses applications, Dunod paris.
- [39] Harborne, J. B., T. Swain.(1969). Perspectives in phytochemistry, Academic press, London, New york.
- [40] Valdés, B., S. Talavera, E. (2015). Fernàndez-Galiano, Flora Vascular de Andalucía Occidental.
- [41] Loisseur, J. (1973). Technique de laboratoire, chimie physique, chimie Biologique, Tome1,Editeurs Masson et CIE.
- [42] Markham. K. R., (1976). <sup>13</sup>C NMR of flavonoids II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones, tetrahedron. Techniques of flavonoides identification, Academic Press,London 32 :2607-2612.
- [43] Hellal Z., (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi\_ Ouzou. 78.

## *Références bibliographiques*

---

- [44] Mohammedi, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologique de quelques plantes médicinales de la Rédiom Nord et Sud, Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat université Abou Beker BelKaid Tilmcen. P58.
- [45] Favier, A. (2003).le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique.p 108-115.
- [46] Roginsky V., Lissi E. A., (2005). Review of méthodes to déterminer chain breaking antioxidant activity in food. Journal of Food chemistry, 92 :235-254.
- [47] Blois M. S., (1958). Antioxydant determinations by the use of stable free radical. Nature. 181 :1199 -1200
- [48] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-wissenschaft and technology, 28 :25-30.
- [49] Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E., (2004). A novel total antioxydant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : The CUPRAC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 : 7970-7981.
- [50] Özyürek Mustafa, Kubilay Güçlü, Tütem Esmâ, Kevser Sözgen Başkan, Erol Erçag, S Esin çelik, Baki Safa, Yıldız Leyla, Kara man Seyda, Apak Resat. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology, Journal of Analytical Method, 3:2439.
- [51] Gouda, A.A. et Amin, A.S., (2010). Copper (II)-neocuporine reagent for spectrophotometric détermination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. Arabian Journal of Chemistry .3,159-165.
- [52] Rice-Evans C, Miller N J, (1994). Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. Methods in Enzymology. 234: 279-293.
- [53] Kujala T. S., Loponen J.M., Klika K.D., Pihlaja k., (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root : distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. Journal of Agricultural and food Chemistry. 48: 5338-5342.
- [54] Blois M. S., (1958). Antioxydant determinations by the use of stable free radical. Nature. 181 :1199 -1200
- [55] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S-E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970–7981.



## *Références bibliographiques*

---

- [56] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- [57] Orak H.H., Yagar H., Isbilir S.S., Demirci A.S., Gumus T., (2013). Antioxidant and Antimicrobial activity of Tea Extracts , *Acta Alimentaria*, 42 : 379-389.

*Conclusion*  
*Générale*

## Conclusion générale

---

La présente étude a porté sur une espèce du genre *Athamanta* de la famille des Apiaceae. Elle a permis de faire l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques, principalement l'activité antioxydante.

A l'issue de l'étude phytochimique de la partie aérienne de cette espèce, nous avons pu isoler un produit de type flavonol (**Kaempférol 3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside**) qui a été identifié, grâce à l'utilisation des méthodes physico-chimiques et spectrales ( $R_f$ , fluorescence, UV-Visible, RMN<sup>1</sup>H).

L'activité antioxydante des extraits éthanolique, *n*-butanol et acétate d'éthyle a été effectuée par les trois méthodes du DPPH, du CUPRAC et de l'ABTS.

Les deux extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle ont révélé une activité antioxydante, modérée par rapport à l'extrait éthanolique par les trois méthodes testés.

En conclusion, la plante étudiée possède une moyenne activité antioxydante en raison d'une quantité faible des polyphénols.

## Résumé

L'étude phytochimique d'une plante du genre *Athamanta* a permis d'identifier les principaux métabolites secondaires de type flavonoides, par les méthodes d'extraction, séparation et purification des composés de l'extrait *n*-BuOH.

La caractérisation par les techniques spectroscopiques, ultraviolette (UV) et la résonance magnétique nucléaire (RMN<sup>1</sup>H), a permis d'identifier le flavonoïde

### **Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside.**

Les deux extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle ont montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait éthanolique, en utilisant les méthodes du DPPH, du CUPRAC et de l'ABTS. Cette activité est modérée comparée à celle du standard **BHA**, Cela a été confirmé par le dosage des polyphénols totaux qui a révélé une faible richesse des extraits éthanolique, *n*-butanol et acétate d'éthyle (en utilisant la méthode de Folin- Ciocalteu).

**Mots clés :** *Athamanta*, Activité antioxydante, flavonoides, polyphénols, Folin- Ciocalteu, DPPH, CUPRAC, ABTS.

## Abstract

The phytochemical study of the genus *Athamanta* identified major flavonoid secondary metabolites through the extraction; separation and purification of the *n*-BuOH extract compounds.

Characterization by spectroscopic, ultraviolet (UV) and nuclear magnetic resonance (RMN<sup>1</sup>H) techniques, made it possible to identify flavonoid **Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside**.

The two *n*-butanol and ethyl acetate extracts showed better antioxidant activity compared to the ethanolic extract, using DPPH, CUPRAC and ABTS methods. This activity is moderate compared to that of the standard **BHA**, This was confirmed by the determination of total polyphenols which revealed a low richness of the extracts ethanolic, *n*-butanol and ethyl acetate (using the method of Folin- Ciocalteu).

**Key words:** *Athamanta*, antioxidant activity, flavonoids, polyphenols, Folin- Ciocalteu, DPPH, CUPRAC, ABTS.

## ملخص

الدراسة الفيتوكيميائية لنبذة طبية من جنس *Athamanta*، مكننا من تحديد الأيض الثانوي الفلافونيدي و باستعمال تقنيات الاستخلاص و الفصل و التنقية المختلفة، تمكنا من عزل مركب فلافونيدي من المستخلص البوتانولي.

أدى استعمال تقنيات التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية (UV) و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد للبروتون ( $^1\text{H}$  RMN) إلى تحديد بنية المركب المفصول:

- **Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside.**

أظهر مستخلصي البوتانول و أسيتات الايثيل فعالية مضادة للأكسدة أحسن مقارنة بمستخلص الأيثانول و في العموم تعتبر هذه الأخيرة متوسطة مقارنة بالمركب المرجعي **BHA** وذلك باستعمال ثلاث طرق مختلفة: DPPH و CUPRAC و ABTS، و هذا ما يعكس المحتوى المتوسط للمستخلصات الثلاث من المركبات الفينولية التي تم معايرتها باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu.

**الكلمات المفتاحية:** ، فلافونويد ، ABTS ، DPPH ، CUPRAC ، Folin-Ciocalteu.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : *SELMANI Nour El Houda*  
*DJENDLI Djihane*

**Etude phytochimique et biologique d'une plante  
du genre *Athamanta* de la famille des *Apiaceae***

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée**

**Résumé**

L'étude phytochimique d'une plante du genre *Athamanta* a permis d'identifier les principaux métabolites secondaires de type flavonoïdes, par les méthodes d'extraction, séparation et purification des composés de l'extrait *n*-BuOH.

La caractérisation par les techniques spectroscopiques, ultraviolette (UV) et la résonance magnétique nucléaire (RMN<sup>1</sup>H), a permis d'identifier le flavonoïde

**Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside.**

Les deux extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle ont montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait éthanolique, en utilisant les méthodes du DPPH, du CUPRAC et de l'ABTS. Cette activité est modérée comparée à celle du standard **BHA**, Cela a été confirmé par le dosage des polyphénols totaux qui a révélé une faible richesse des extraits éthanolique, *n*-butanol et acétate d'éthyle (en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu).

**Mots-clefs :** *Athamanta*, Activité antioxydante, flavonoïdes, polyphénols, Folin-Ciocalteu, DPPH, CUPRAC, ABTS.

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**M<sup>me</sup>. KHALFALLAH Assia**

**MCA. CUM-Mila**

**Encadreur**

**M<sup>me</sup>. BOUTAGHANE Naima**

**MCA. UFM-Constantine 1**

**Examineur 1**

**M<sup>me</sup>. BERREHAL Djemaa**

**Pr. UFM-Constantine 1**

**Examineur 2**