



**Université Mohamed Khider de Biskra**  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA NATURE  
ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Matière  
Filière : Chimie  
Spécialité: Chimie pharmaceutique

Réf. :

---

**Présenté et soutenu par :**  
BELAICHE Fatiha

Le : 26, Juin.

## Etude phytochimique de la plante *Teucrium polium*

---

### Jury :

M <sup>r</sup>	BEN AKCHA Rachid	MCB	Université de Biskra	Encadreur
Mr	BOUKRAA Issam	MCB	Université de Biskra	Président
M <sup>me</sup>	BOUBEKRI Chrifa	Prof	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021-2022

## ***REMERCIEMENT***

<< Louanages à **ALLAH** le tout puissant qui m'a aidé durant toute ma vie >>

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au Laboratoire de chimie Organique du département des science de la matière, de la faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Med Khi der Biskra.

Je remercie sincèrement Monsieur, **Benakcha rachid**; enseignant à l'université de Biskra au département de chimie, que directeur de ce mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration.

Je remercie les membres du jury **Boukraa Issam, Boubekri Chrifa**, d'avoir accepter de juger ce modeste travail.

Je remercie Monsieur **Mhani Moukhtar** le directeur de Lancien siège pour m'avoir autorisé d'effectuer quelques manipulations dans son laboratoire de phytochimie au Centre de Recherche Scientifique et Techniques sur les Régions Arides **CRSTRA**.

Je remercie Melle **Fatima Dellouche** qui ma aidé à réaliser ce travail.

Je remercie tous les enseignants de chimie pharmaceutique de l'université de biskra.

A tous les chers je vous dis merci pour tous.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*À mes chers Parents Moussa et Ben djedidi Fatma*

*A mon mari Monsieur Yahia Rachid*

*A mes très chères enfants : Melissa, Youssef, Zakaria.*

*A mes frères,*

*A mes sœurs,*

*A toute ma famille de près ou de loin.*

*A tous ceux qui me connaissent*

*A tous ceux qui aiment la science.*

*Fatiha.*

# Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1

## Chapitre I : Les flavonoïdes

I.1. Introduction.....	2
I.2. Structure chimique et classification des flavonoïdes.....	2
I.2.1. Structure chimique.....	2
I.3. Classification des flavonoïdes.....	3
I.4. Biosynthèse des flavonoïdes.....	5
I.5. Propriétés des flavonoïdes.....	6
I.5. 1. Propriétés physico-chimiques.....	6
I.5.1.a. Solubilité des flavonoïdes.....	6
I.5.1.b. Stabilité des flavonoïdes.....	8
I.6. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes .....	9
I.7. Utilisations thérapeutiques.....	9
I.8. Les flavonoïdes et la santé.....	11
I.8.1. Le quatuor vital anti-âge .....	11
I.8.2. Effets des flavonoïdes sur la santé.....	12
I.8.2.a. Protection vasculaire.....	12
I.8.2.b. Flavonoïdes et ménopause.....	13
I.8.2.c. Un espoir pour le Cancer.....	13
I.8.2.d. Anti-inflammatoire et diabète.....	13

I.8.2.e. Antiinfectieux.....	14
I.8.2.f. Elixir de Jouvence.....	14
I.8.2.g. Bronzage végétal.....	14
I.9. Utilisation des flavonoïdes.....	14
I.9.1.Métabolisation.....	14
I.9.2.Utilisation dérivées.....	15
I.9.3. Un puissant édulcorant.....	15
I.9.4.Un engrais miracle.....	15
I.10. Rôle des flavonoïdes dans la plantes.....	15
I.11. Distribution des flavonoïdes.....	15
I.12.Sources alimentaires.....	16
I.13. Activité biologiques des flavonoïdes .....	16

## **Chapitre II : Extraction et détection des flavonoïdes**

II. Extraction, isolement, purification et analyse structurales des flavonoïdes.....	18
II.1.Récolte des plantes.....	18
II.2.Extraction des flavonoïdes.....	18
II.3.Méthodes de séparation et de purification.....	18
- La chromatographie de partage.....	19
-La chromatographie d'exclusion.....	19
-La chromatographie d'absorption.....	19
- La chromatographie d'absorption sur colonne.....	19
-La chromatographie sur papier.....	19
- La chromatographie liquide à Haute performance (CLHP).....	19
- La chromatographie en phase gazeuse (CGP).....	19
II.3.1. La chromatographie sur couche mince.....	20
II.4 Effet du rapport frontal (Rf).....	21

II.5. Les technique d'identification structurales des flavonoïdes.....	22
II.6. La fluorescence sous lumière de Wood.....	22
II.7.La spectrophotométrie UV-Visible.....	23
- Absorption dans le méthanol.....	25
- Absorption en présence des réactifs.....	27
II.7.2. L'hydrolyse acide des hétérosides.....	30
II.8. La spectroscopie Infrarouge.....	30
II.9. La spectrométrie de masse.....	31
II.10. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	31
II.11. Les réaction de coloration.....	32
II.11.1. Réaction de cyanidine (réaction avec Mg).....	32
II.11.2. Réaction avec Zn/HCl.....	32
II.11.3. Réaction de strontium-vapeur d'ammoniac .....	33

### **Chapitre III Etude phytochimique (partie expérimentale)**

III. 1. Introduction.....	34
III. 2. Présentation de l'espèce Teucrium Polium.....	34
-Nom anglais.....	34
-Nom français.....	34
- Nom vernaculaire.....	34
-Nom latin.....	34
-Nom Tamazight.....	34
III.3. Classification Systématique.....	34
III.4. Origine.....	35
III.5. Utilisation traditionnelle.....	35
III.6. Extraction des flavonoïdes.....	35
III.6.1. Extraction solide-liquide.....	36
III.6.2.Extraction par décantation.....	38
III.6.2.a. Extraction par l'éther de pétrole.....	38
III.6.2.b. Extraction par le chloroforme.....	39
III.6.2.c. Extraction par l'acétate d'éthyle.....	40
III.6.2.d. Extraction par le n-butanol.....	40
III.7. L'étape de rota vapeur.....	41
III.8. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	41

III.8.1. préparation de la cuve chromatographique.....	42
III.8.2. Dépôt de l'échantillon sur la plaque.....	42
III.8.3. Développement du chromatogramme.....	42
III.8.3.a. pour l'extrait chloroformique.....	42
III.8.3.b. pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	42
III.8.3.c. pour l'extrait de n-butanol.....	43
III.8.4. Les systèmes Utilisés.....	43
III.9. Résultats et discussion.....	43
III.9.1. pour l'extrait chloroformique.....	43
a- Chromatogramme 1.....	43
b- Chromatogramme 2.....	43
c- Chromatogramme 3.....	43
d- Les valeurs de Rf des taches.....	44
III.9.2. pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	45
a- Chromatogramme 1.....	45
b-Chromatogramme2.....	45
c-Chromatogramme3.....	45
d-Les valeurs de Rf des taches.....	46
III.9.3. pour l'extrait de n-butanol.....	46
a- Chromatogramme 1.....	46
b- Chromatogramme 2.....	47
c-Chromatogramme 3.....	47
d-Les valeurs de Rf des taches.....	47
III.10. Discussion des résultats.....	48
III.11. Etude de l'activité antibactérienne des extraits chloroformique, Acétate d'éthyle , et n-Butanol.....	48
III. 11.1. Définition.....	48
III. 11.2. Description des bactéries étudiées.....	48
- Listeria monocytogène.....	48
- Escherichia coli.....	49
- Bacilles Creus.....	49
III.11.3. Etude de l'activité antibactérienne.....	49

III.11.4. Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme).....	50
a- Repiquage des espaces bactériennes.....	51
b-Préparation de l'inoculum.....	51
c-Préparation des disques.....	52
d-Ensemencement.....	52
e-Lecture.....	52
III.11.5. Résultat et discussion .....	53
Conclusion.....	55



## Liste des figures

### Chapitre I

<b>Figure I-1</b>	Squelette de base des flavonoïdes	2
<b>Figure I-2</b>	Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C	3
<b>Figure I-3</b>	Biosynthèses des flavonoïdes	5

### Chapitre II

<b>Figure II-1</b>	Schéma de la chromatographie sur couche mince	20
<b>Figure II-2</b>	Schéma de l'analyse CCM des flavonoïdes	21
<b>Figure II-3</b>	Bandes caractéristiques d'un squelette flavonique	23
<b>Figure II-4</b>	Déplacement bathochrome de la bande I	29
<b>Figure II-5</b>	Complexes stables entre les flavonoïdes et AlCl <sub>3</sub>	30

### Chapitre III

<b>Figure III-1</b>	<i>Teucrium Polium</i>	34
<b>Figure III-2</b>	Schéma d'extraction des flavonoïdes	36
<b>Figure III-3</b>	Macération	37
<b>Figure III-4</b>	Filtration	37
<b>Figure III-5</b>	Evaporateur rotatif	38
<b>Figure III-6</b>	Extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole	39
<b>Figure III-7</b>	Extraction liquide-liquide avec le chloroforme	39
<b>Figure III-8</b>	Extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle	40
<b>Figure III-9</b>	Extraction liquide-liquide avec le n-butanol	41
<b>Figure III-10</b>	CCM par le système Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl cétone (4/3/3)	43
<b>Figure III-11</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (7/3/1)	44
<b>Figure III-12</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1,5/2/0.1)	44
<b>Figure III-13</b>	CCM par Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl cétone (4/3/3)	45
<b>Figure III-14</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (7/3/1)	45
<b>Figure III-15</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1,5/2/0.1)	46
<b>Figure III-16</b>	CCM par Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl cétone (4/3/3)	46
<b>Figure III-17</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (7/3/1)	47
<b>Figure III-18</b>	CCM par H <sub>2</sub> O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1,5/2/0.1)	47
<b>Figure III-19</b>	Plan général de la partie Antibactérienne	50
<b>Figure III-20</b>	Appareil vortex 3	51
<b>Figure III-21</b>	Antibiogramme des extraits Préparés : <b>A.</b> Bactéries Escherichia coli. <b>B.</b> Bactéries Listeria mono cétogène. <b>C.</b> Bactéries Bacilles Serrus	54

## Liste des tableaux

### Chapitre I

<b>Tableau I-1</b>	Classe des flavonoïdes	3
<b>Tableau I-2</b>	Utilisation thérapeutique de quelques flavonoïdes	10

### Chapitre II

<b>Tableau II-1</b>	Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes	21
<b>Tableau II-2</b>	Relation entre fluorescence et la structure des flavonoïdes	22
<b>Tableau II-3</b>	Bandes d'absorption de quelques exemples de flavonols	25
<b>Tableau II-4</b>	Bandes d'absorption de quelques exemples de flavones	25
<b>Tableau II-5</b>	Effet de substitution sur les bandes d'absorption des Flavonoïdes	26
<b>Tableau II-6</b>	Différents domaines d'absorption UV-Vis des flavonoïdes	27

### Chapitre III

<b>Tableau III-1</b>	Systèmes utilisés pour l'extrait chloroformique ; d'acétate d'éthyle et n-Butanol	43
<b>Tableau III-2</b>	Valeurs de Rf de l'extrait chloroformique	45
<b>Tableau III-3</b>	Valeurs de Rf de l'extrait acétate d'éthyle	46
<b>Tableau III-4</b>	Valeurs de Rf de l'extrait n-butanol	47
<b>Tableau III-5</b>	Zone d'inhibition en mm des extrait de Polium Teucrium sur Les souches bactériennes testées	53

## ABREVIATIONS ET SYMBOLS

**G**: gramme

**MG** : milligramme

**CM** : centimètre

**NM** : nanomètre

**MM** : millimètre

**M** : mètre

**μM** : micro mètre

**ML** : millilitre

**H** : heure

**C°** : degré Celsius

**T** : Température

**D** : densité

**SM** : spectrométrie de masse

**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**CPG** : Chromatographie Phase Gazeuse

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

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**UV** : Ultraviolet

**IR** : Infra rouge

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**EtOH** : Ethanol

**BuOH** : Butanol

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

**HOAc** : Acide acétique

**M-H:** milieu Mueller Hinton

**E.C.** Escherichia coli

**L.M.** : Listeria monosytogène

**B.S.** :Bacilles Serrus

# **Introduction Générale**

### Introduction générale

Un grand nombre de plantes médicinales, aromatiques, plantes à Epices et autres possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine , en pharmacie, en cosmétologie et dans le domaine de l'agriculture. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet , les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches aussi bien *in vivo* qu' *in vitro*, en particulier, la recherche de nouveaux constituants naturels comme alternative thérapeutique .

Actuellement, selon, l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**), plus de 80% de la population mondiale, recours aux drogues essentiellement à base de matières végétales. De plus, près de 25% des prescription sont à base de plantes médicinales et environ 60 à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle [1].

Les flavonoïdes très connus pour leurs activités biologiques, ont montrés Leurs activités, antimicrobiennes, leurs utilisations en cosmétique et en agro-alimentaire [2,3], ont des effets immunosuppresseurs [4], cytotoxique et cytostatique [5,6], anti inflammatoire, anti-nociceptif, antimicrobienne [7,8], et anti-inflammatoire[9].

Nous avons choisi d'étudier l'espèce *Polium teucrium* et l'objectif de ce travail est l'extraction des flavonoïdes des parties aériennes de la plante. Ce travail est divisé en 3 parties:

- Le premier chapitre présente des généralités sur les flavonoïdes.
- Le deuxième chapitre présente l'extraction et détection des flavonoïdes.
- Le troisième chapitre présente la présentation de *polium teucrium* et présentation des protocoles expérimentaux, les résultats obtenus .

# **Chapitre I**

## **Les Flavonoïdes**

## I.1. Introduction

Les flavonoïdes sont des groupes de composés poly phénoliques naturels qui sont largement répandus dans le règne végétal. Il se produisent naturellement comme des pigments végétaux dans un large éventail de fruits et légumes ainsi que dans des boissons telles que le thé et la bière [10]. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires à C15 composés de deux cycles aromatiques reliés par un pont à trois carbones avec une fonction éther situé à l'extrémité du pont. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes de flavonoïdes tels que les dihydrochalcone, chalcones, flavanones, isoflavanones et aurones [11].

Les flavonoïdes ont longtemps été perçus comme un pigment qui donnait de la couleur aux plantes. La première observation en ce qui concerne leur activité biologique a été publiée par [12,13], qui avaient d'abord cru qu'il s'agissait d'une vitamine, qu'ils nommèrent la vitamine P. Le terme a ensuite été abandonné puisque les flavonoïdes ne rencontraient aucune des caractéristiques associées à la définition d'une vitamine.

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme les groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl [14-15].

## I.2. Structure chimique et classification des flavonoïdes

### I.2.1. Structure chimique

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques : deux cycles à C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (figure I-1) [16,17].

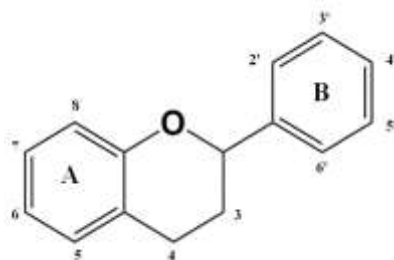


Figure I-1 : Squelette de base des flavonoïdes

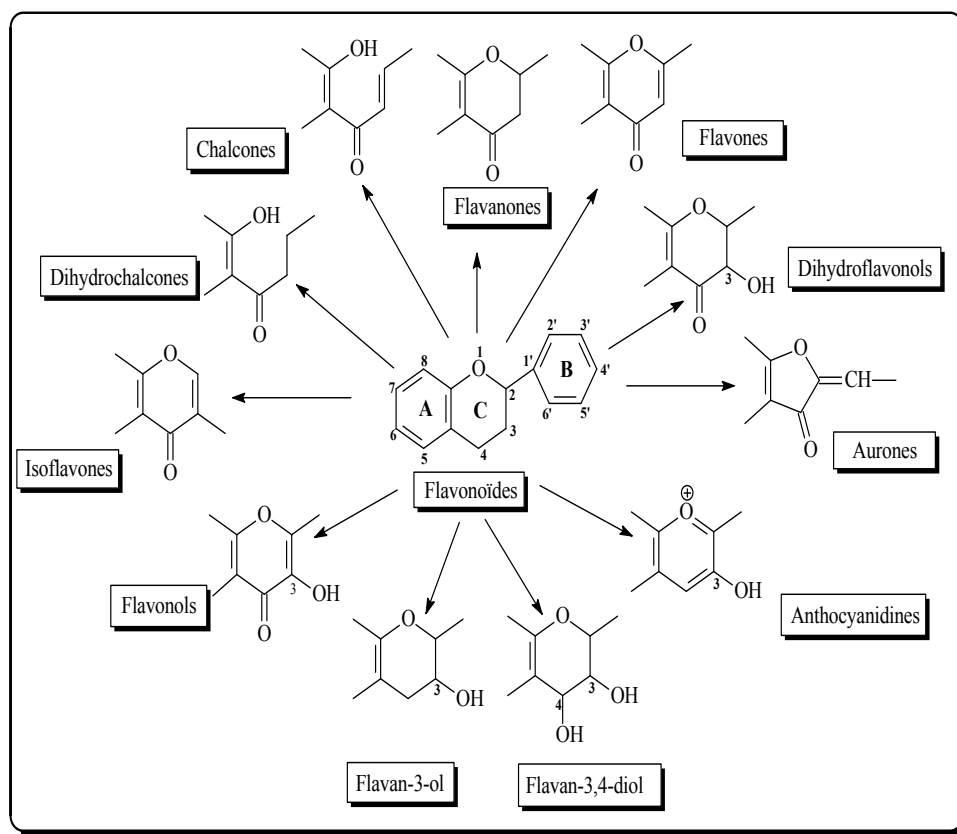


### I.3. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont donc, en commun, une même structure, dont la nature du pont à 3 atomes de carbone et les multiples substitutions permettent de les diviser en plusieurs classes, ce qui est représenté par le tableau (I-1) et la figure (I-2) [18].

**Tableau I-1 : Classe des flavonoïdes**

Flavones	Flavonols	Flavonone	Isoflavones	Chalcones	Aurones
Apigénine	Kaempférol	Eriodictyol	Génistéine	Butéine	Sulfurétine
Lutéoline	quercétine			Phlorétine	



**Figure I-2 :** Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

- **Flavones et Flavonols**

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 [19].

- **Flavanones et hydroflavonols**

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les Flavones et les Flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 [20].

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

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle en C4. Cette position peut être (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 palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou Keracyanine[21].

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés [21].

- **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 substitution sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone [21].

Néanmoins, selon d'autres auteurs [22], 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.

#### I.4. Biosynthèse des flavonoïdes

Comme ça a été précisé auparavant, Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaînes en C3, on parle alors de chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (figure I-3)[ 23 ].

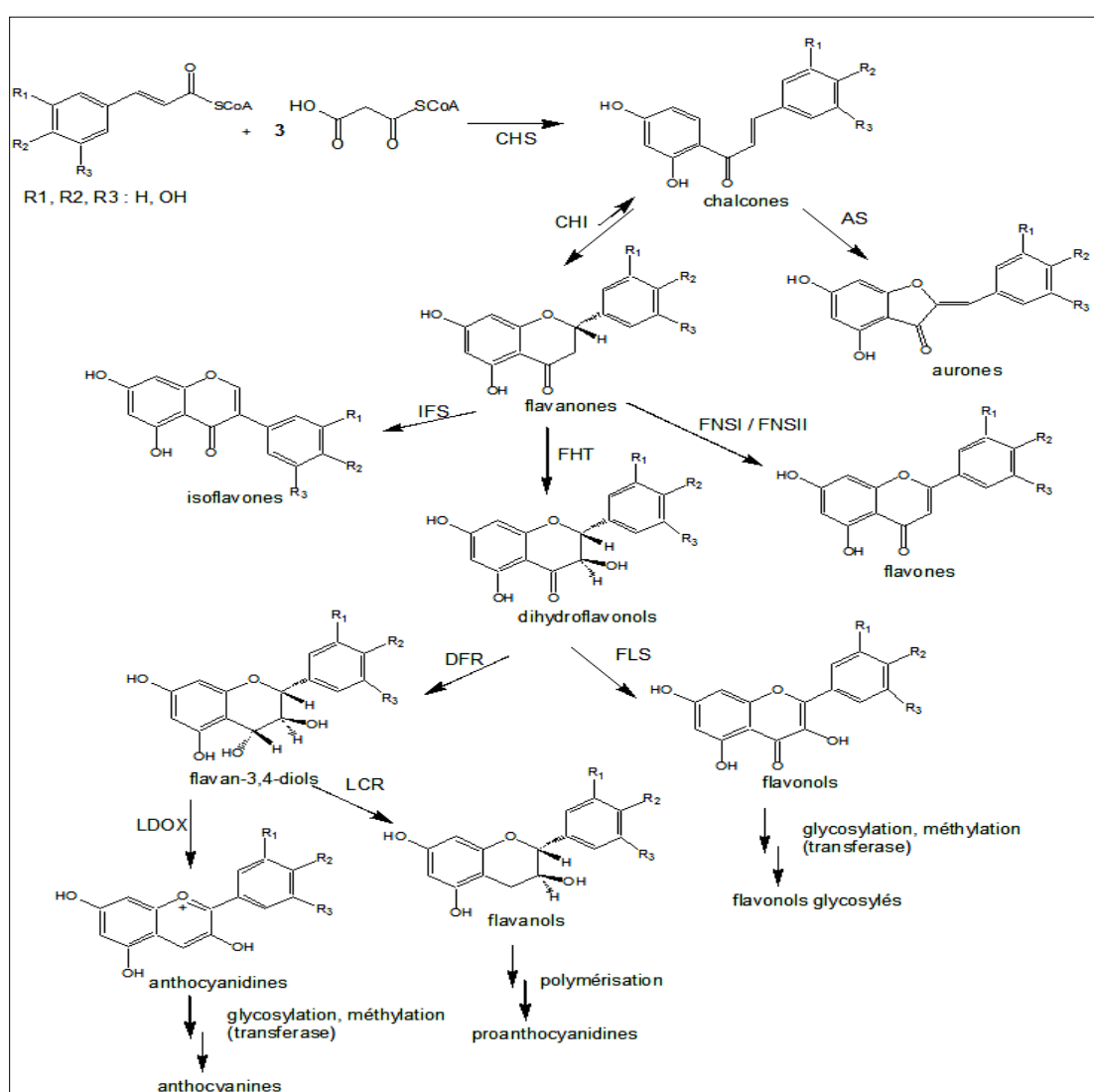


Figure I-3: Biosynthèses des flavonoïdes

## I.5. Propriétés des flavonoïdes

- ❖ Ce sont des solides cristallisés dont la teinte, varie du blanc ivoire au jaune vif. Ces hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les solvants organiques. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires.
- ❖ Les flavonoïdes sont aussi solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque et potasse) donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.
- ❖ Ils Protègent les plantes contre les radiations UV.
- ❖ Ils Possèdent un spectre d'absorption dans l'ultra violet avec , généralement deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique [24].
- ❖ Il sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infection bactériennes et virales.
- ❖ Il fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- ❖ Ils régulent l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits [25].

### I.5.1. Propriétés physico-chimiques

#### I.5.1.a. Solubilité des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes :

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaire concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques.
- Des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle).
- Des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine ) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde.
- Des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain PH.

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, la solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du PH [26]. En effet, à un PH 1,5 ,la solubilité de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu' à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée.

D' autre part, la solubilité de la rutine, de la naringénine et de la quercétine dans l'eau à 20° C est respectivement de l'ordre de 25 mg/L ; 0,5 mg/L et 10 mg/L. Des travaux antérieurs ont évalué la solubilité de la néohespéridinedihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol [27]. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12g/L et 123 g/L.

La faible solubilité des flavonoïdes dans les phases aqueuses et lipophiles laisse leurs incorporation dans les formulation pharmaceutiques et alimentaires difficiles. Toutefois, la métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation ) de ces composés par les cellules de l'intestin permet leur absorption par l'organisme[ 28].

Pour pallier à ces problèmes de solubilité, différentes techniques ont été utilisées ayant pour but de modifier la structure de ces molécules:

- La glycosylation de la naringine par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus*, a permis l'augmentation de sa solubilité dans l'eau de 250 fois [29].
- La complexation de la naringénine et de l'hespéretine avec de la  $\beta$  cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité dans des milieux hydrophiles à différents pH [30].
- L'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2-phosphonomyo-inositol) [31]. l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine, ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine [32].

Cependant, [33, 34] ont observé, respectivement, une augmentation de la Solubilité de l'hespéretine et de la catéchine dans les phases grasses après acylation par des acides gras.

- La polymérisation de la rutine a permis d'augmenter sa solubilité dans l'eau [35].

#### **I.5.1.b. Stabilité des flavonoïdes**

L'importante réactivité des flavonoïdes donne à ces molécules une instabilité à plusieurs condition environnantes.

##### ▪ *Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes*

Les paramètres qui peuvent agir sur la stabilité des flavonoïdes sont la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non et d'oxydant. Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes.

En effet, la stabilité est plus faible à des pH basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion superoxyde). La nature du solvant affecte le mécanisme de dégradation des flavonoïdes.

En effet, lors de l'étude de la dégradation de la quercétine par le DPPH (1-diphényl-2-picrylhydraxyl), [36]. A observé la formation de produits différents en milieu protique et aprotique. De même [37]. Ont rapporté, lors de l'étude de la photostabilité du 3-hydroxyflavone, des voies de dégradation différentes selon la nature du solvant avec une amélioration de la stabilité en présence de cyclodextrines.

##### ▪ *Auto oxydation des flavonoïdes*

Les cinétiques et les mécanismes d'oxygénation des flavonoïdes ont été étudiés par [38]. Cependant, le pH, la présence d'ion métallique et de borate affectent l'auto oxydation de la catéchine en milieu aqueux.

Les produits formés au cours de l'auto-oxydation sont très variables mettant en évidence des voies de dégradation différentes selon la nature du flavonoïdes et des conditions de conservation.

## **I.6. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes**

Les intérêts thérapeutiques des flavonoïdes ont été démontrés. Pour citer quelques exemples, nous pouvons dire que :

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétine avait une activité anti diarrhéique très importante. Le mécanisme de ces composés consistait à augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale. Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces [39].

De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase, Mais pour confirmer et mettre le point sur les différentes activités biologiques des flavonoïdes qui nous ont d'ailleurs poussés à aborder ce travail.

## **I.7. Utilisation thérapeutiques**

La grande majorité des dizaines de médicaments à base de flavonoïdes, des plantes à flavonoïdes actuellement disponibles sont << proposés dans >> équivalent à << amélioration de >> ou << utilisation dans >> équivalent à << traitement d'appoint de >>. Ce qui traite le faible niveau de preuves de leur efficacité. Dans le cas des médicaments à base de plantes au sens de la note explicative de 1998 le libellé de l'indication retenue est du type : << traditionnellement utilisé dans >> (code 15 à 18 de l'annexe 1). Ces remarques comme d'ailleurs l'indication énumérée ci-dessous sont valables pour les anthocyanosides, les pronthocyanidols, leur dérivés et les plantes qui en contiennent.

C'est essentiellement dans le domaine capillaro-veineux que l'on utilise les flavonoïdes : seul ou associés, ce sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs et veinotoniques et des topiques utilisés en phlébologie.

La plupart des spécialités actuellement disponibles ont les indications ou proposition d'emploi suivantes (tableau I-2).

- Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences du primo-décubitus).
- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaires. Ou utilisé dans les manifestations fonctionnelles.
- Utilisé dans le traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire.
- Traitement des métrorragies lors de la contraception par micro progestatifs et des métrorragies dues au port du stilet, après leur exploration chimique et para chimique.
- Traitement symptomatique des ménométrorragie lors d'une ontraoption par dispositif intra-utérin.
- Utilisé dans les m'trorragies induites par le port d'un dispositif intra-uérin après bilan étiologique.
- Utilisé dans (ou traitement d'appoints des) les boisses d'acuité et les trouble du champ visuel présumés d'origine vasculaire.
- Traitement du lymphodéne du membre supérieur après traitement radio chirurgical du cancer du sein.

**Tableau I-2:** utilisation thérapeutiques de quelques flavonoïdes

<b>Flavonoïdes</b>	<b>Emploi thérapeutique</b>
Thomonime	-diurétique
Cirsiliol	-digestive
Nepitrine	-anti-inflammatoire -anti-arthrique
Hypolaetion-8-glycoside	-anti-inflammatoire -anti-ulcère
Dimethyl 'therapigenine Fisetine	-anti-inflammatoire
8-méthoxycirsilineol	-antispasmodique -stomachique



Cirisimaritine	-anti-prurique
Baicaleine	-anti-septiquee
Nepetine, eupatorine, eupatiline, jaceosidine, hipidulin et 5,7,4'-trih 6-ome flavone	Traitement des tumeurs
Quercetine	-anti-malaria -traitement du para influenza
Glucoside-3-Kaempferol	-crises hémorridaires
Rutinoside-3-Kaempferol	-troubles cardio-vasculaires
3-methyl quercetin	-anti-viral
Morine	-traitement du poliovirus
Rutinoside-7-hesperetin (flavanone)	-maladies cèrèbrales vasculaires -hypotension
Rhamnosyie-3-kaempferol Glucoside-3-kaempferol	-activté analgésique
c-glycosyl flavonoïdes	-maladies rénales

## I.8. Les flavonoïdes et la santé

Il semble que les premières recherches aient porté sur les effets protecteurs des flavonoïdes. Protection contre le rayonnement UV, les virus et bactéries pathogènes, qui infectent les plantes. Pendant longtemps, ils ont été considérés comme des facteurs antinutritionnels, puisque certains travaux avaient démontré qu'il limitaient l'appétence et la digestibilité des herbivores qui consommaient des plantes riches en flavonoïdes [40]. Depuis la reconnaissance de leurs propriétés antioxydants et de leurs effets bénéfiques sur la santé, c'est un tout autre regard qu'on leur porte.

### I.8.1. Le quatuor vital anti-âge

Il est composé de trois vitamines :

- ❖ Vitamine A ou beta-carotène
- ❖ Vitamine C
- ❖ Vitamine E et des flavonoïdes.

### **I.8.2. Effets des flavonoïdes sur la santé.**

L'une des premières propriétés reconnue aux flavonoïdes est d'être <<veino-actif>>, c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

Le *Chrysanthellum americanum* contient des flavonoïdes qui améliorent la microcirculation au niveau des mains et des pieds et auraient également une incidence favorable dans les cas de couperose. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydant du plasma dans les heures qui suivent le repas.

Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density lipoproteins ou LDL), qui sont des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribuant à réduire le flux sanguin et conduisant à l'asphyxie des tissus irrigués). En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus [41]. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse.

#### **I.8.2.a. Protection vasculaire**

Une étude menée aux Pays-Bas (l'étude Zutphen) a mis en évidence, le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres [42]. Ainsi, grâce à l'effet synergétique des flavonoïdes, de nombreuses plantes remarquables sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires : ginkgo, hamamélis, noisetier, petit houx, marron d'Inde, sarrasin.

Certains flavonoïdes de l'orange ont fait preuve d'activités vasodilatatrices, qui pourraient être mises à profit au cours de processus isochémiques. La purarine, extraite du *Radixpueriae*, une herbe traditionnelle chinoise, est employée depuis des décennies en Orient, dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'angine de poitrine.

### **I.8.2.b. Flavonoïdes et ménopause**

On leur reconnaît aussi de effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones du soya interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des œstrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée.

Pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-oestrogènes. La quercétine de l'oignon et kaempferol de la chicorée, possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. De nouvelles études restent cependant nécessaires pour valider ces effets sur l'être humaine.

### **I.8.2.c. Un espoir pour le Cancer**

Les flavonoïdes ont pour effet d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topoisomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodgkin. Les flavonoïdes, ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le côlon et le poumon [43,44].

### **I.8.2.d. Anti-inflammatoire et diabète**

Des recherches récentes nous démontrent que les flavonoïdes, notamment les flavanols du cacao, peuvent aussi prévenir la douleur musculaire, en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. Spécifiquement, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. On a également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires [45].

C'est également de même processus de synthèse de l'oxyde nitrique qui renverserait la dysfonction endothéliale responsable des pathologies diabétiques. Des polyphénols issus du thé et de la cannelle potentialiseraient l'action de l'insuline dans les cellules.

L'extrait aqueuse de *T. polium* a montré un effet hypoglycémiant chez les rats. La propriété insulino-tropique de cet extrait a été encore évaluée, *in vitro*, en utilisant des îlots pancréatiques de rat [46]. Les données ont indiqué l'extrait brut aqueux est capable de réduire le taux du glucose sérique principalement en augmentant la

sécrétion d'insuline par le pancréas par comparaison aux ilots témoins. Cependant, les composés responsables de l'activité hypoglycémique ne sont pas encore élucidés [47].

#### **I.8.2.e. Anti-infectieux**

Outre leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-obstructives, les flavonoïdes accélèrent le processus de destruction des agents pathogènes en améliorant la capacité des macrophages à les neutraliser. La transformation des macrophages en antigène est donc plus rapide et les lymphocytes-T peuvent intervenir avec plus d'efficacité [45].

#### **I.8.2.f. Elixir de Jouvence**

Des composés extraits des myrtilles ou des épinards amélioreraient la signalisation des messages nerveux, un phénomène intéressant pour le grand âge.

#### **I.8.2.g. Bronzage végétal**

Une étude préliminaire sur l'utilisation d'extraits de plantes comme filtres UV a démontré que l'incorporation de flavonoïdes à une solution à 2% de filtre solaire synthétique, augmente sensiblement l'indice de protection de celui-ci.

### **I.9. Utilisation des flavonoïdes**

#### **I.9.1. Métabolisation**

Les formes libres (rares) et glucosylées des flavonoïdes peuvent être directement absorbés au niveau de l'intestin grêle, alors que les formes glycosylées elles, doivent d'abord être le sang, les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native. Ils sont transformés par des enzymes de conjugaison [45].

En fait, la biodisponibilité des flavonoïdes est très variable, selon les composés considérés. Pour assurer un effet biologique, il est donc nécessaire d'avoir une alimentation riche et variée en produits végétaux afin d'optimiser l'apport en flavonoïdes aussi bien sur le plan qualitatif et quantitatif.

### **I.9.2. Utilisation dérivées**

Leurs effets antioxydantes sont utilisés dans l'industrie alimentaire, pour la conservation des huiles comestibles ainsi qu'en cosmétologie dans les shampoings colorants. Leurs propriétés antiulcéreuses sont exploitées elles, pour certaines préparations de plantes médicinales [45].

### **I.9.3. Un puissant édulcorant**

Un puissant édulcorant, la néohespéridine dihydrochalcone (=E959) est utilisée en alimentation pour les boissons non alcoolisées. Cet édulcorant est synthétisé à partir d'un flavonoïde particulier : la néohespéridoside qui est une molécule naturelle amère [48].

### **I.9.4. Un engrais miracle**

Le généticien Don Smith a associé un cocktail de bactéries fixatrices d'azote (les inoculum) et de flavonoïdes. Le résultat a été concluant: La symbiose entre les bactéries et les racines s'est faite plus rapidement, la fixation de l'azote a commencé plus tôt en saison, la croissance de la plante s'est accélérée et en bout de piste, la récolte a augmenté d'un moins 10%.

## **I.10. Rôle des flavonoïdes dans les plantes**

La fonction des flavonoïdes dans les fleurs est de fournir des couleurs attrayantes pour les pollinisateurs des plantes [49,50]. Dans les feuilles, ces composés sont de plus en plus admis de promouvoir la suivie physiologique de la plante, le protégeant des agents pathogènes fongiques et de rayonnements UV [50,51].

En outre, les flavonoïdes sont impliqués dans la photosensibilisation, le transfert d'énergie, l'action des hormones de croissance des plantes et des régulateurs de croissance, le contrôle de la détermination de la respiration et la photosynthèse, la morphogénèse et le sexe [52].

## **I.11. Distribution des flavonoïdes**

Les flavonoïdes se répartissent dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) ou ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique), et parfois dans les racines [53]. Au niveau cellulaire, les flavonoïdes de type hétérosides,

sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux [54]. En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal .

### **I.12. Sources alimentaires**

Les poly phénols sont des produits largement distribués dans la règne végétal et sont consommés quotidiennement. La plupart des flavonoïdes proviennent d'extraits de plantes, comme c'est le cas pour le thé, la vin et la cacao. [55,56]. Par contre , ils sont plus particulièrement consommés sous forme de fruits et de légumes dans notre société occidentale. [57]. Les sous-classe des Flavonols et des Flavones sont présentent dans notre alimentation .

Les flavonoïdes constituent un élément important de la diète chez l'humain et tel que démontré, on les retrouve dans un grand nombre de fruits et légumes. Ils sont également présents dans plusieurs herbes et épices , comme le persil et le thym et on les retrouve également dans le miel [57]. L' aneth est l'herbe aromatique qui contient le plus de myricétine et l'on retrouve le kaempférol en grande quantité dans les câpres.

Chez certains fruits , comme le citron, les flavonoïdes, toutes sous-classe confondues, peuvent représenter jusqu'à du fruit frais [58]. Les flavonoïdes de faible poids moléculaire sont responsables de l'amertume et du gout acide et aigre de certains fruits alors que les flavonoïdes de haut poids moléculaire, plus particulièrement les tannins , sont responsables de l'astringence de certains fruits [58].

### **I.13. Activité biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes dont la principale raison de leur biosynthèse est de lutter contre les agressions de l'environnement extérieur. Les plantes utilisent la capacité d'adsorption entre 280 et 315 nm de tous les flavonoïdes comme un filtre de protection contre les dommages pouvant être causés par les radiation UV-B sur leur ARN [59].

Les flavonoïdes jouent également un rôle dans la protection des plantes contre les insectes et les animaux herbivores. Dans ce cas ; ce sont surtout les tannins qui

sont mis à contribution pour leur capacité de complexation avec les protéines salivaires ou digestives en influençant le goût et la valeur nutritionnelle de la partie de la plante ingérée. C'est pour cette raison que de nombreux herbivores consomment préférentiellement les feuilles les plus jeunes ; moins riche en tannins.

Les flavonoïdes sont également utilisés dans une autre interaction entre le règne végétale et animal ; en attirant les insectes afin de réaliser la pollinisation des fleurs.

L'ultraviolet proche du visible attire alors certains insectes tels que les abeilles qui distinguent ces longueurs d'ondes. La couleur des fruits généralement due aux anthocyanes attire certains animaux et participe ainsi à la propagation de l'espace. La nécessité des flavonoïdes pour les plantes explique leurs présences dans toutes les parties constitutives de la plante que ce soit les feuilles ; la tige ou les fleurs [59].

**Chapitre II**  
**Extraction et détection**  
**des flavonoïdes**



## II. Extraction et détection des flavonoïdes

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

- ✓ Récolte de la plante
- ✓ Extraction
- ✓ Séparation et purification
- ✓ Identification structurale des produits isolés

### II.1. Récolte des plantes

Les espèces sélectionnées sont collectées dans leur habitat naturel. La détermination botanique des espèces est réalisée par des taxonomistes.

### II.2. Extraction des flavonoïdes

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [60]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire. Les étapes essentielles sont :

- ❖ La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétale en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.
- ❖ Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le n-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- ❖ Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement de séparation chromatographique.

### II.3. Méthodes de séparation et de purification

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des

mélanges complexes. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide [61]. Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles on peut citer :

❖ **La chromatographie de partage**

C'est une chromatographie liquide-liquide. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides. La phase stationnaire non miscible avec la phase mobile.

❖ **La chromatographie d'exclusion**

Elle est aussi appelée filtration sur gel ou tamisage moléculaire ou par permutation de gel (le séphadex). La phase stationnaire est un solide poreux : Les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent plus lentement dans les pores du gel.

❖ **La chromatographie d'adsorption**

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

❖ **La chromatographie d'adsorption sur colonne**

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers système de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [62].

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

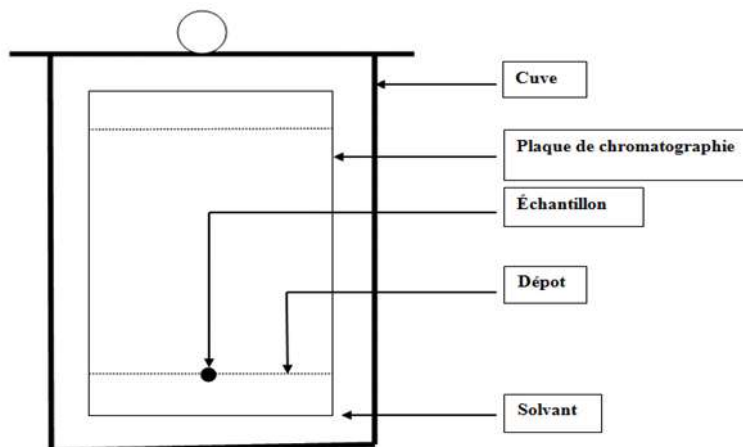
❖ **La chromatographie sur papier.**

❖ **La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).**

❖ **La chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

### II.3.1. La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) (figure II-1) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites.

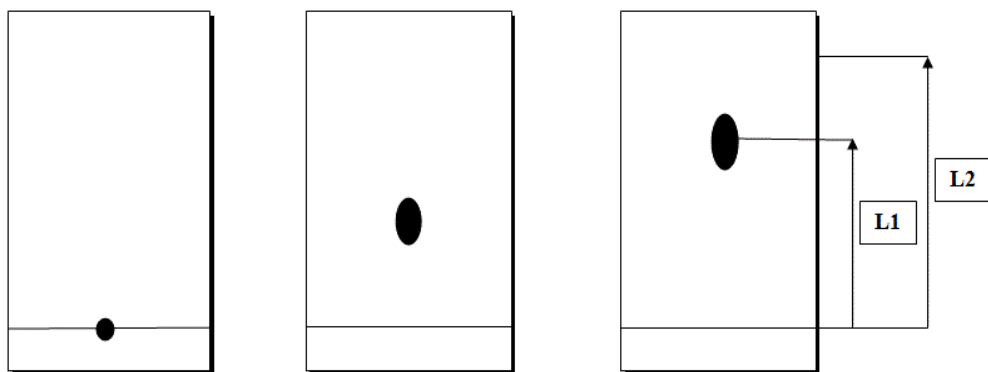


**Figure II-1** : Schéma de la chromatographie sur couche mince

Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption avec comme phase stationnaire une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimension variables (généralement 20x20 cm, 10x10 cm ou 5x10 cm) avec une épaisseur comprise entre 0,5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé [63].

Le but de connaître la composition de l'extrait brut, de faire une comparaison entre deux ou plusieurs extraits bruts et de trouver par conséquent, le système de solvant donnant une bonne séparation [64].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'ondes =254 nm et 365 nm). Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal (Rf) (figure II-2).



**Figure II-2:** Schéma de l'analyse CCM des flavonoïdes.

La valeur du (Rf) est définie comme suit:

$$Rf = L1/L2$$

Avec :

L1 : la distance entre l'origine et la substance.

L2 : la distance entre l'origine et le front du solvant.

#### II.4. Effet du rapport frontal (Rf)

Le rapport frontal (Rf) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tache du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. Il est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé (organique ou aqueux) sur un support "phase stationnaire" donnée (gel de silice, polyamide, cellulose). Notant que la valeur du Rf varie avec le type de squelette flavonique (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition de ses différents substituant. Le tableau (II-1) montre l'effet de la substitution du squelette sur la valeur du Rf [65,66].

**Tableau II-1 :** Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes (Abdelkader, 2001).

Structure flavonique	RF
Augmentation des (OH)	Diminution du RF
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation des valeurs de RF
Acétylation	Augmentation des valeurs de RF
Glycosylation	Diminution des valeurs de RF du principalement de L'introduction de nouveaux

	groupements (OH)
--	------------------

## II.5. Les techniques d'identification structurales des flavonoïdes

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N) avec ses différentes techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, etc..) la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement par des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible que reste la méthode de choisie pour ce type de composés [67,68]. Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur  $R_f$  dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

## II.6. La fluorescence sous lumière de Wood

La fluorescence sous lumière de Wood (la longueur d'onde de 365nm) des flavonoïdes donne des renseignements très utiles sur leurs structures chimiques préliminaires [69].

L'examen en lumière UV est la méthode la plus utilisé pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau (II-2) résume la relation entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

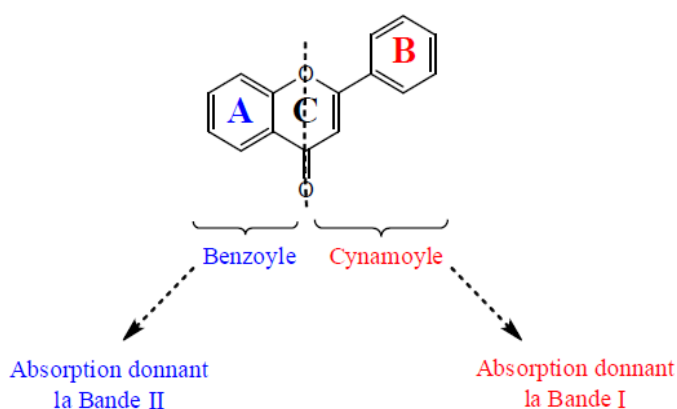
**Tableau II-2:** Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes :

Couleur de tache	Type de flavonoïde
Noir	Flavonols 5,6, 7 tris OH libres Flavonols 5,6,8 tris OH libre
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4-OH Flavones 3-OH et 5-OH ,4-OH Flavones 6 ou 8-OH Chalcones Dhydroflavonols Isoflavones

	Flavanones
Bleu Claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols avec 3-OH libre ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre Aurones, Chalcones, Flavanones
Jaune pale	Dihydroflavonols

## II.7. La spectrophotométrie UV-Visible

C'est une technique très importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle permet la localisation des hydroxyles libres et leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol. Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : La bande I et la bande II (figure II-3) [70].



**Figure II-3:** Bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

### a- Absorption dans le méthanol [71]

L'absorption ultraviolette des flavonoïdes dans le méthanol neutre donne deux bandes:

**La bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

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

La bande **I** étant à la structure cinnamoyle (qui fait intervenir la conjugaison du groupement C=O de l'hétérocycle centrale avec le noyau B) et la bande **II** contrôlée par la structure benzoylé (qui fait intervenir la conjugaison du groupement C=O de l'hétérocycle centrale avec le noyau A). Ceci est mis en évidence par la considération de l'influence sur le spectre d'absorption des substituons fixés sur les noyaux A et B).

La substitution (fixe d'un groupement OH) sur le noyau B modifie plus la bande **I** que la substitution sur le noyau A et réciproquement pour la bande **II**.

En règle générale, la position de la bande **I** permet de distinguer la structure flavonol de la structure flavones : en effet dans le premier cas la bande **I** se situe entre 330 et 360 nm alors que dans le second cas elle se présente 305 et 350 nm. Les isoflavones, les flavanones et les flavonols se distinguent des flavones et des flavonols par leur spectre UV, qui présente une bande **II** très intense et une bande **I** très faible ou presque absente, ce qui est dû à l'absence de la conjugaison entre les cycles A et B ou l'affaiblissement de son effet. La bande **II** est généralement observée dans la région de 270 et 290 nm, pour les flavanones et les Flavonols, alors qu'elle sort dans la région de 245 et 270 nm pour les isoflavones.

Pour les méthyle-3-flavonols, l'absorption dans l'UV proche apparaît entre 350 et 364 nm (tableau II-3 et tableau II-4). Le (tableau II-3) donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanoïque pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau II-3 : Bandes d'absorption de quelques exemples de Flavonols

Flavonols	Bande I	Bande II	Substitution en					
			3	5	6	7	8	3'
Galanigine	359	267	OH	OH	-	OH	-	-
Kaempférol	365	268	OH	OH	-	OH	-	-
Quercétine	370	265	OH	OH	-	OH	-	OH
Me-3-K	350	269	Me	OH	-	OH	-	-
Me-3-Q	358	254(272)	Me	OH	OH	OH	-	OH

Tableau II-4 : Bandes d'absorption de quelque exemple de flavones.

Flavones	Bande I	Bande II	Substitution en					3'	4'
			5	6	7	8			
Chryisine	313	247		OH	OH	-	-	-	
Apigénine	336	267		OH	OH	-	-	-	
Lutéoline	349	253(267)		OH	OH	-	-	OH	

Comme nous montrent les données des précédents tableaux pour des composés appartenant à la même série, toute augmentation du nombre des hydroxyles sur le noyau B s'accompagne d'un effet bathochrome de la bande I, par ailleurs, la bande II, pic



unique vers 270 nm pour un noyau B monosubstitué ou non substitué. Sa transformation en un pic vers 250 nm pour un noyau B bi ou tri substitué.

En ce qui concerne le noyau A, en générale dihydroxyle en 5 et 7, les incidences spectrophotométrie entraînées par les principales modifications structurales dans le cas des Flavonols sont les suivants :

1. L'introduction d'un hydroxyle en C-8 produit un effet bathochrome de 13 à 16 la bande I avec apparition d'un pic d'absorption supplémentaire 330 nm.
2. L'introduction d'un hydroxyle en 6-C produit d'un effet hypsochrome d'environ 8 à 10 nm, annulé par la méthylation de cet hydroxyle [73].
3. La substitution d'hydroxyle 7 n'a aucune incidence sur le spectre UV alcoolique, par contre celle d'hydroxyle 5 s'accompagne d'un effet hypsochrome (6 à 7 nm) de la bande I.
4. La perte d'hydroxyle en C-5 entraîne un effet hypsochrome de 6nm de la bande I. L'atténuation de la bande II et l'apparition d'un maximum secondaire aux environ de 320nm. Il y a lieu de noter que ces règle ne sont par transposables aux cas des Flavones, on observe des comportements très spécifique en particulier pour tout ce qui concerne l'incidence de l'hydroxylation en C-6 et C-8 (Tableau II-5 et Tableau II-6).

**Tableau II-5 :** Effet de substitution sur les bandes d'absorption des flavonoïdes.

	<b>Bande I</b>	<b>Bande II</b>	<b>Substitution en</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Quercétine	370	256	-	OH	-		OH
Fisetine	366(319)	240		-	-	OH	-
Azaléztine	364	252		OCH3	-	OH	-
Rhamnétine	371	256	-	OH	-		OCH
Gossypétine	385	261		OH	-		OH

			OH			
Cornicotagétine	377	258		OH	OHOH	OCH3
Quercétagétine	360	258		OH	OHOH	-
Patulétine	371	258		OH	OCH3	-

**Tableau II-6 :** Différents domaines d'absorption UV- Vis des flavonoïdes.

Bande I (nm)	Bande II (nm)	Type de Flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	310-360	Flavonols (3-OR)
250-280	330-285	Isoflavones
245-275	310-330 épaulement pic à 320	Isoflavones (5-dioxy-6,7-dioxygénés )
275-295	300-330 épaulements	Flavanones et dihydroflavonols
230-370 (faible intensité)	340-390	Chalcones
230-270 (faible intensité)	380-440	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanidines et anthicyanines

#### b- absorption en présence des réactifs :

L'utilisation des réactifs spécifiques permet d'indiquer la nature des substituants sur le squelette flavonique.

#### II. 7.1. Addition de réactifs (série spectrale UV)

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

##### a) Spectre en présence de NaOH:

**NaOH** ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II.

Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'. Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position. Des hydroxyles libres [74].

L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7. Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [75].

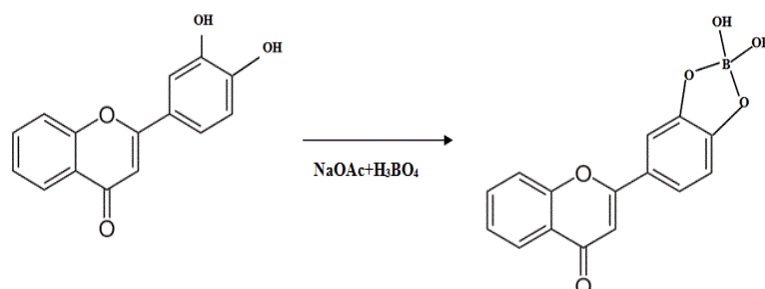
#### **b) Spectre en présence de NaOAc**

L'acétate de sodium, **NaOAc**, base faible, ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH, et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8. Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [76], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné.

#### **c) spectre en présence de NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système ortho-dihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I (figure II-4) [77].



**Figure II-4 :** Déplacement bathochrome de la bande I

**d) spectre en présence de  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ :**

La présence (ou l'absence) de système ortho dihydroxyle dans les flavonoïdes peut être déduit à partir de l'analyse de leur spectre dans le méthanol avant et après l'addition de chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique. Dans ces cas la formation d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en 5 (ou en 3) et d'un complexe labile avec le système ortho dihydroxyle sur les cycles A ou B (figure II-5) (**Selvestin et al**).

L'utilisation de ( $\text{AlCl}_3$ ) pour la détection de groupement ortho dihydroxylé, se traduit par un effet bathochrome de bande I par rapport au spectre méthanoïque neutre.

L'addition de HCl permet de s'assurer de la stabilité du complexe formé. La présence d'un système ortho dihydroxyle est observée, sur le spectre obtenu avec l' $\text{AlCl}_3$  acidifié par déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm hypsochrome de la bande I de 20nm, est significatif d'une Flavone trisubstitué sur le noyau B. D'autre parte le spectre obtenu avec ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ) donne un déplacement bathochrome de la bande I de 60 nm, ce qui indique la présence de OH libre en 3, et éventuellement en 5, un déplacement de cette bande de 35 à 55 nm signifié que l'hydroxyle en position 5 est libre.

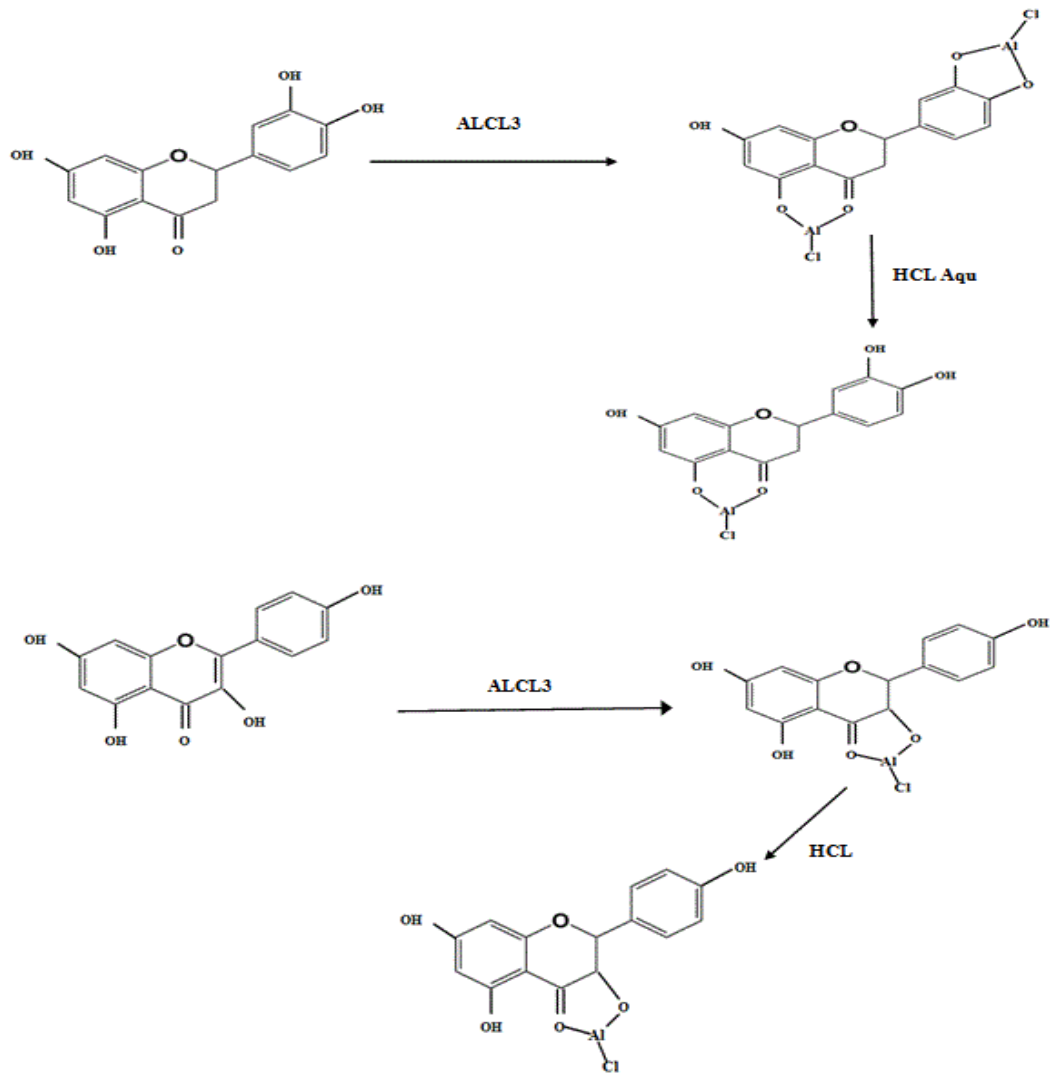


Figure II-5 : Complexes stables entre les flavonoïdes et AlCl<sub>3</sub>

### II.7.2. L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes *O*-glycosylés, elle renseigne sur la position et la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par Co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides *C*-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

### II.8. La spectroscopie Infrarouge:

La spectroscopie IR est utilisée en général pour identifier les groupements fonctionnels d'une molécule, cette méthode est très employée dans les laboratoires de chimie

,de manière plus simple et routinier sachant que de domaine de fréquence le plus couramment utilisé s'entend de  $4000\text{cm}^{-1}$  à  $600\text{cm}^{-1}$ .

- En solution dans un solvant apolaire, on observe une bande fine à  $3610\text{cm}$ . Il s'agit de la vibration d'élongation de la liaison O-H libre.
- Pour le composé pur, on observe une bande large  $3200\text{cm}<3480\text{cm}<3400\text{cm}$ . Il s'agit des liaisons O-H associées par liaison hydrogène intermoléculaire.

Certains composés polyfonctionnels possèdent une liaison hydrogène intramoléculaire ( $3480\text{cm}$ ). Ce type de liaison se distingue facilement d'une liaison intramoléculaire. En effet, une telle bande n'est pas affecté lors de dilution du composé dans un solvant interne comme  $\text{CCl}_4$ .

## II.9. La Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet la détermination du poids moléculaire des aglycones ainsi que le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles. Les ruptures de liaison chimiques au sein de l'ion moléculaire, donnent des ions fragments caractéristiques, ces derniers fournissent des renseignements utiles,, notamment sur la substitution des noyaux A et B [78]. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse qui sont :

- L'ionisation par impact électronique (IE)
- L'ionisation par impact électronique à haute résolution (IEHR)
- The Fast Atom Bombardment(FAB)

Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . D'autres ions peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou Par addition de chlorure de sodium  $\text{NaCl}$  (on obtient l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié.

## II.10. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale du squelette flavonique ainsi que les différents substituant [79]. Cette méthode renferme plusieurs technique telles que :

### **RMN du proton (1H)**

Le spectre RMN du proton informe sur les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogène présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

### **RMN carbone (13C) : DEPT 135° et J mod**

Cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH<sub>3</sub>), secondaires (CH<sub>2</sub>), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135 et le j mod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le j mod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

## **II. 11. Les réactions de coloration**

Les flavonoïdes peuvent être reconnus expérimentalement par de différentes réactions de coloration. Il y a plusieurs réactions de coloration utilisée dans l'identification de type de flavonoïdes, et la réaction de cyanidine.

### **II.11.1. Réaction de cyanidine (réaction avec Mg)**

Les réactions donnent avec le magnésium en présence de l'acide chlorhydrique (HCl) des différents couleurs ce qui donne une idée sur le type de flavonoïdes. Les flavones donnent généralement une couleur jaune orange avec le magnésium chlorhydrique, et les flavonols une couleur rouge et les flavonols une couleur violette.

### **II.11.2. Réaction avec Zn/HCl**

On peut remplacer le Mg par le Zn dans la procédure de la réaction de cyanidine, seulement les dihydroflavols (ou Flavonols) produisent des colorations rouge

violettes avec le zinc en présence de l'acide chlorhydrique. Les flavanones et les Flavonols peuvent être donnés une faible coloration (couleur rose) avec le Zn en présence de HCl.

### **II.11.3. Réaction de strontium-Vapeur d'ammoniac**

Cette réaction est utilisée essentiellement pour distinguer entre les flavones et les Flavonols-3-O-substitué, 5,6-dihydroxylé, 6-méthoxylé.



# **Chapitre III**

## **Etude phytochimique**

### III.1. Introduction

*Teucrium polium* (figure III-1) de la famille des lamiacées, est une plante vivace souvent pérenne, recouverte de poils laineux qui donnent une couleur grise bleutée. Le *Teucrium* est une plante à tige nombreuses et ramifiées, et à fleurs blanches ou jaunâtres en grappes denses au sommet des rameaux. Les feuilles ont une forme linéaire ou lancéolée à marge en générale révoluée, denticulée, crénelée. Cette espèce est très polymorphe, suivant le degré méditerranéen, commune dans l'Atlas saharien, elle pousse surtout dans les lits pierreux des oueds et dans les roches, en altitude entre 1200 et 2600 mètres [80, 81].



Figure III-1 : *Teucrium polium*

### III.2. Présentation de l'espèce *Teucrium polium*

- ✓ **Nom anglais :** mountain germander.
- ✓ **Nom français :** pouliot de montagne. germandrée tomenteuse, germandrée blanc-grisâtre.
- ✓ **Nom vernaculaire :** j'ada, khayata, katabetledjrah.
- ✓ **Nom latin :** *Teucrium Polium*, synonymes : *Teucrium tomentosum*, *Teucrium gnaphalodes*, *Teucrium chamaedrys* et *Teucrium capitatum* [82, 83].
- ✓ **Nom Tamazight :** Tayrart ,Thazirekth .

### III.3. Classification systématique

- ✓ **Règne :** plantae.
- ✓ **Ordre:** Lamiales.
- ✓ **Famille:** Lamiaceae.
- ✓ **Genre:** *Teucrium*.
- ✓ **Espèce:** *polium* .

### III.4. Origine

Elle est assez commune dans l'espace méditerranéo-saharien, plus rare au Sahara septentrional et au Tassili, elle pousse dans les lieux rocailleux et secs, les lits arides, les roches et les sables [84, 85]. C'est une plante méditerranéenne, commune dans l'atlas saharien. Elle pousse surtout dans les lits pierreux des oueds et dans les roches en altitude entre 1200 et 2600 m [86, 87]

- **En Algérie**

Wilaya de M'sila, Médéa, bourdj-Bou-Arredj, Setifet Bouira, L'oustdjelfa, L'est de Batna, Biskra et Boussaâda.

### III.5. Utilisation traditionnelle

Le genre *Teucrium* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle depuis plus de 2000 ans dans de nombreuses régions du monde. Ses feuilles sont utilisées en cuisine et à des fins médicinales, en particulier pour le traitement des troubles intestinaux et gastriques. Il est également utilisé pour soulager les douleurs viscérales et diminuer la glycémie. La plante est utilisée comme dépuratif et remède des maladies du foie et de l'hypertension et dans le traitement des ulcères gastéro – duodénaux et de l'hyperlipidémie [88]. En médecine traditionnelle africaine, cette plante est utilisée dans les périodes de stress, car il permet de se relaxer, de se détendre en augmentant la force et la relaxation des muscles, il entraîne également la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité et favorise le sommeil et permet également la stimulation de la mémoire, et l'augmentation de la concentration et la lucidité. Elle possède également une action bénéfique sur la digestion. Ses propriétés antistress et antioxydantes permettent de lutter contre le vieillissement de la peau. [89].

La médecine populaire confère au *Teucrium polium* de nombreuses propriétés pour traiter les inflammations et les rhumatismes. Son extrait a démontré des pouvoirs hypotenseurs [90], antispasmodiques, antibactériens et antipyrétiques diaphorétiques, tonifiant, des effets analgésiques [91], et des effets antioxydants [92,93]. L'extrait aqueux de *Teucrium polium* a longtemps été utilisé en Iran pour le traitement du diabète et possède des effets hypolipidémiques [94].

### III.6. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est basée sur leurs solubilités dans les alcools (éthanol, méthanol) et les solvants organiques selon qu'il s'agit de matériel frais ou sec [95]. Ils n'ont

pas la même propriété de solubilité. L'éthanol a été choisi parce qu'il ne représente aucune toxicité par rapport au méthanol, mais l'eau favorise la solubilisation des sucres.

### III.6.1. Extraction solide-Liquide

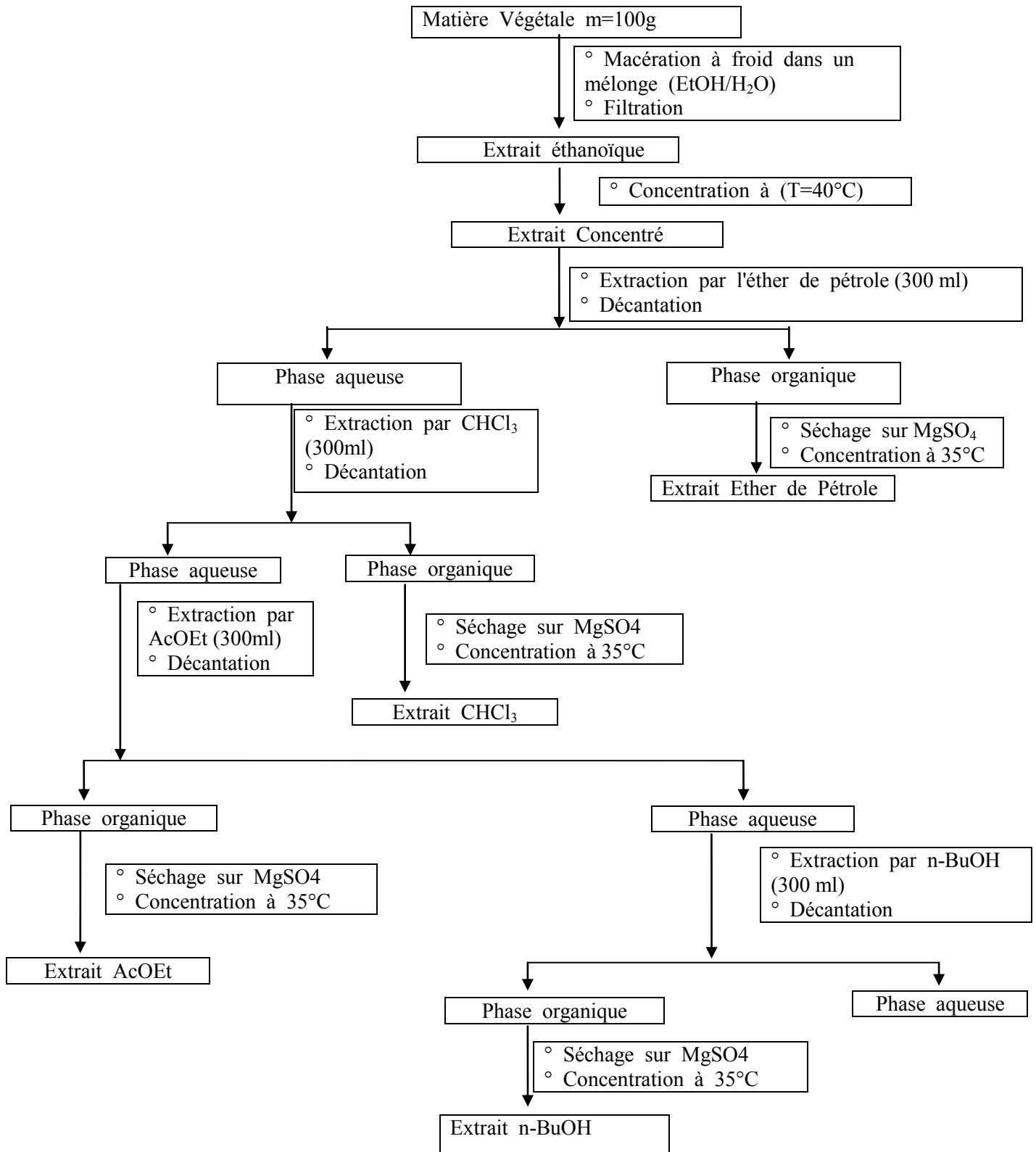


Figure III-2 : Schéma d'extraction des flavonoïdes.

### ❖ Macération en milieu hydroalcoolique

100 g de la poudre végétale (les parties aériennes de *Teucrium polium*) sont mises à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau : 70/30) à températures ambiante, pendant 24 heures (figure III-3).



**Figure III-3 : Macération**

### ❖ Filtration

Filtrer le mélange sous vide et récupérer le filtrat (Figure III-4).



**Figure III-4 : Filtration**

Les extraits hydroalcooliques obtenus suivie d'une évaporation de l'éthanol (solvant) à l'aide d'un évaporateur rotatif (figure III-5).



**Figure III-5 :** Evaporateur rotatif

**Remarque:**

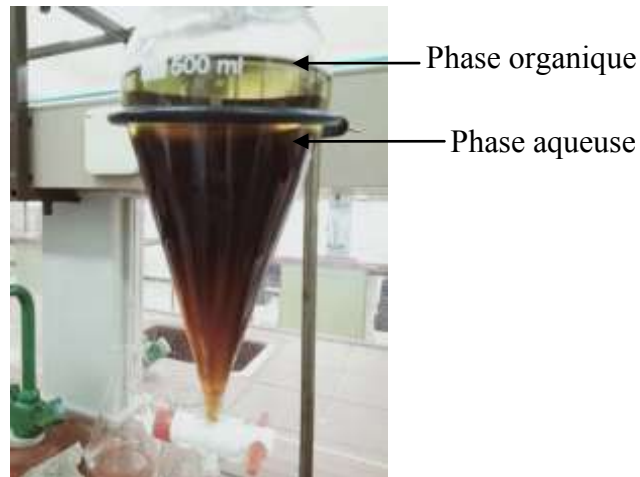
L'évaporation des extraits précédents a été faite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le plus souvent, l'évaporation du solvant est menée sous pression réduite (afin d'accélérer l'étape) que l'on obtient au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide.

**III.6.2. Extraction par décantation.**

L'extraction liquide-liquide est une mise en œuvre de l'extraction par transfert entre deux phases liquides, dans une ampoule à décanter, les deux liquides séparent les solutés en fonction de leur solubilité dans chaque solvant.

**III.6.2.a. Extraction par l'éther de pétrole**

L'éther de pétrole (gazoline) est un solvant organique apolaire aprotique, appelé aussi essence. L'éther de pétrole le plus utilisé est la fraction 40 à 60°C, Il permet d'éliminer la chlorophylle et les lipides et la sève. On introduit (300 ml) d'éther de pétrole dans l'ampoule à décanter, après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un erlenmeyer la phase organique supérieure (d'éther de pétrole) de couleur jaune claire (figure III-6).

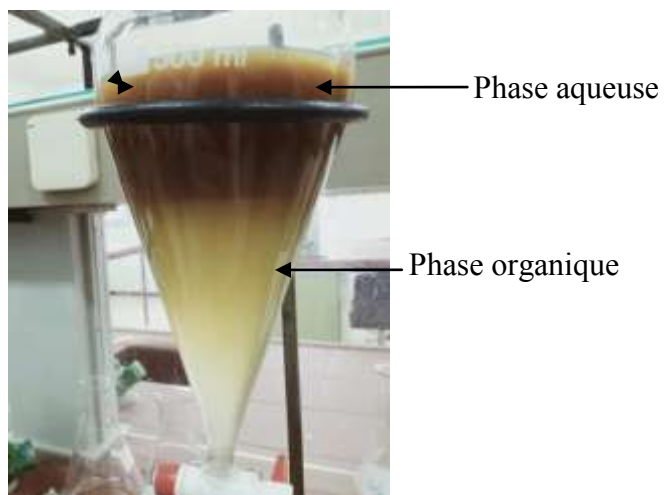


**Figure III-6 :** Extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole.

### III.6.2.b. Extraction par le chloroforme

Le chloroforme est un composé organique de formule  $\text{CHCl}_3$ , Sa densité ( $d=1,483$ ). Ce liquide incolore, dense et de gout sucré est un trihalométhane [96]. Les plantes sont donc extraites avec du chloroforme pour entraîner les flavonoïdes aglycones.

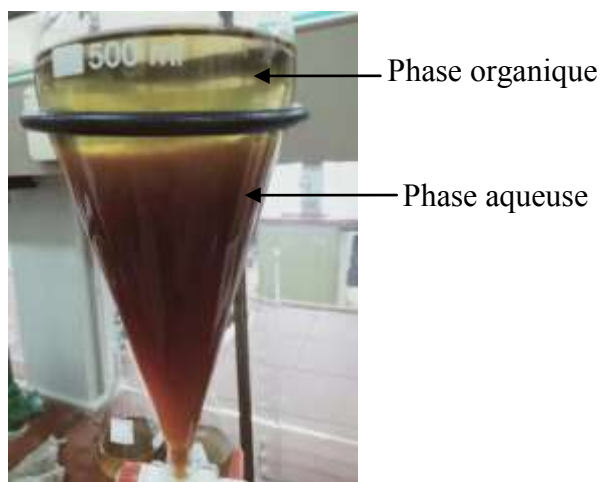
On ajoute (2.150 ml) de chloroforme à la phase aqueuse, après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un erlenmeyer la phase organique inférieure ( le chloroforme) de couleur jaune foncé (figure III-7).



**Figure III-7 :** Extraction liquide-liquide avec le chloroforme.

### III.6.2.c. Extraction par l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est un liquide très inflammable dont les vapeurs forment un mélange explosif avec l'air. Les vapeurs sont trois fois plus lourdes que l'air et peuvent parcourir de longues distances jusqu'à une source d'ignition et provoquer un retour de flamme. On ajoute (300 ml) d'acétate d'éthyle à la phase aqueuse traité préalablement par le chloroforme et contenue dans l'ampoule à décanter, après agitation et décantation des deux phases, ensuite on récupère dans un erlenmeyer la phase organique supérieure (d'acétate d'éthyle) avec une couleur jaune claire (figure III-8).



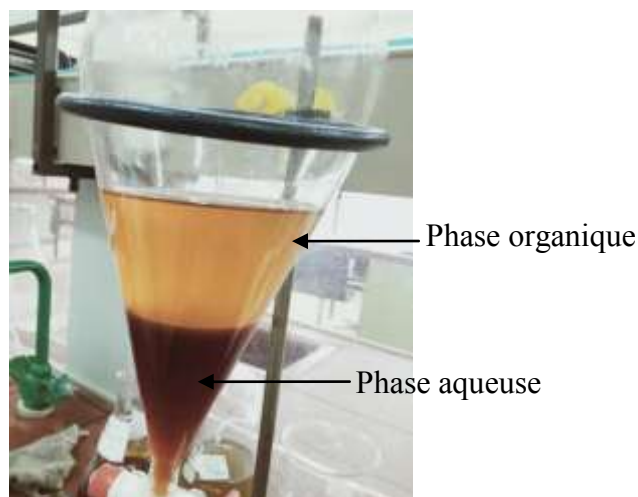
**Figure III-8 :** Extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle.

### III.6.2.d. Extraction par le n-butanol

Le n-butanol est soluble dans l'eau ; il est miscible à l'alcool, à l'éther et à la plupart des solvants organiques. C'est par ailleurs un bon solvant des graisses, des huiles et des résines. Comme tous les alcools primaires, il subit les réactions d'oxydation et de déshydrogénation conduisant à la formation d'aldéhyde butyrique .

Le butanol brûle avec une flamme très lumineuse, et sa densité ( $d=0,810$ ). On ajoute (300 ml) de n-butanol à la phase aqueuse traité par l'acétate d'éthyle et contenue dans l'ampoule à décanter, après agitation et décantation des deux phases, on récupère dans un erlenmeyer la phase organique supérieur (de n-butanol) avec une couleur orange (figure III-9).





**Figure III-9 :** Extraction liquide-liquide par le n-butanol.

### III.7. Etape de rotavapeur

Les phases organiques obtenus a évaporé par un rotavapeur sont :

- ✚ l'extrait chloroformique ( $d=1,43$ ) et ( $T=40c$ ).
- ✚ l'extrait de l'acétate d'éthyle ( $d=0,9$ ) et ( $T=45c$ ).
- ✚ l'extrait de n-butanol ( $d=0,810$ ) et ( $T=60c$ ).

### III.8. contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince (CCM)

#### ❖ Méthode

Les analyses de chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de gel de silice à l'emploi (0,25 mm d'épaisseur), sur support semi-rigide en aluminium. C'est une méthode facile et très rapide, de séparation basé sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase [97].

A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées (d'où son nom). Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses

qualitatives et quantitatives. Aussi, permet-elle de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant [98].

### III.8.1. Préparation de la cuve chromatographique

- ✓ Introduire le mélange des solvants
- ✓ Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- ✓ Fermer la cuve.

### III.8.2. Dépôt de l'échantillon sur la plaque

- ✓ Dépôt environ **0,5 $\mu$ l** de l'échantillon en un point à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque (le diamètre de la tache doit être d'environ 2mm pour la disposition de plusieurs produits).
- ✓ Sécher à l'aide d'un séchoir.

### III.8.3. Développement du chromatogramme:

#### A. *Pour l'extrait chloroformique*

- ✓ Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV-Visible 254 et 365 nm
- ✓ Les couleurs des spots ont été enregistrées, ainsi de même pour le Rf.

#### B. *Pour l'extrait d'acétate d'éthyle*

- ✓ Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV-Visible 254 et 365 nm.
- ✓ Les couleurs des spots ont été enregistrées, ainsi de même pour le Rf.

### C. Pour l'extrait de n-Butanol

- ✓ Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV-Visible 254 et 365 nm.
- ✓ Les couleurs des spots ont été enregistrées, ainsi de même pour le Rf.

### III.8. 4. Les systèmes utilisés

Les systèmes utilisés pour notre extrait sont réunis dans le tableau (III-1).

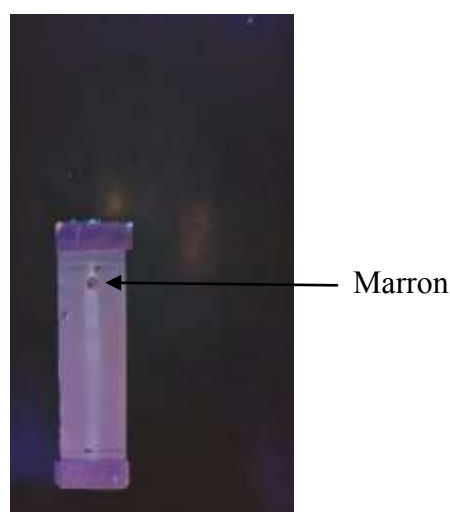
**Tableau III-1** : Les systèmes utilisés pour l'extrait chloroformique, d'acétate d'éthyle et n-Butanol.

Eluant	Volume (ml)
Toluène/Ethanol/Méthyléthyl cétone	(4/3/3)
H <sub>2</sub> O/Méthanol/Méthyléthyl cétone	(7/3/1)
H <sub>2</sub> O/Butanol/Ethanol/Acide acétique	(3/ 1,5 /2/ 0,1)

## III.9. Résultats et discussion

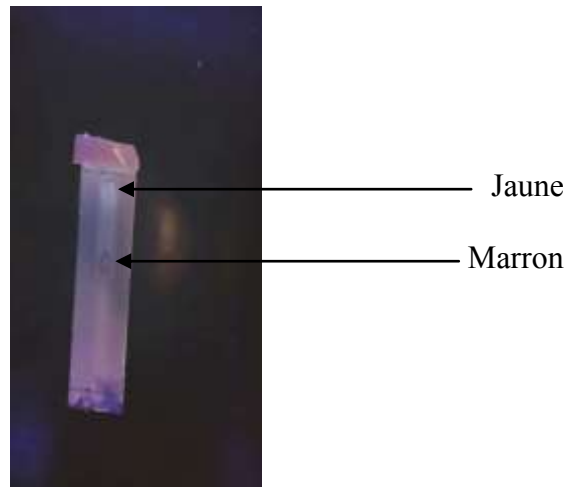
### III.9.1. Pour l'extrait chloroformique

#### ❖ Chromatogramme 1



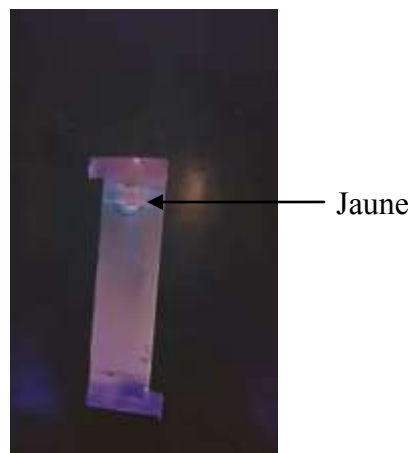
**Figure III-10** : CCM par le système Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl cétone (4/3/3)

## ❖ Chromatogramme 2



**Figure III-11** : CCM par H<sub>2</sub>O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone/ (7/3/1)

## ❖ Chromatogramme 3



**Figure III-12**: CCM par H<sub>2</sub>O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1,5/2/0.1)

**Les valeurs de R<sub>f</sub> des taches :**

$$R_f = h / H$$

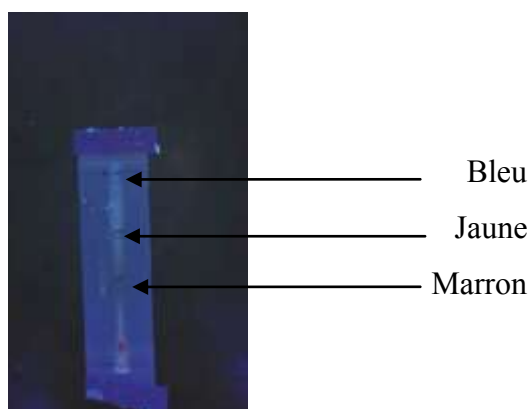
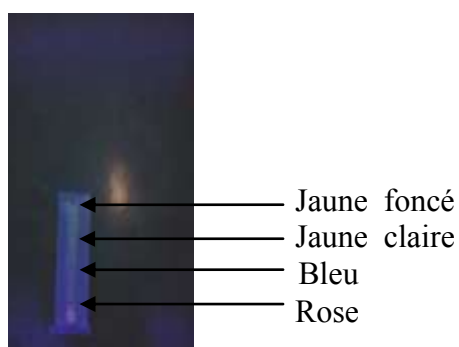
Avec :

H : La distance parcourue par le composé.

H : La distance parcourue par le solvant.

**Tableau III-2** : Valeurs de Rf de l'extrait chloroformique

Le système utilisé	Les taches	H	h	Les valeurs de Rf (cm)
Toluène/EtOH/méthyle éthyle cétone(4/3/3)	marron	4,5	4,1	0,91
H <sub>2</sub> O/MeO/méthyle éthyle cétone (7/3/1)	Jaune	5,8	5,5	0,94
	Marron	5,8	3,8	0,6
H <sub>2</sub> O/BuOH/EtOH/acide acétique(3/1,5/2/0,1)	Jaune	5	4,5	0,9

**III.9.2. Pour l'extrait d'acétate d'éthyle**❖ **Chromatogramme 1 :****Figure III-13** : CCM par Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl cétone (4/3/3)❖ **Chromatogramme 2****Figure III-14** : CCM par H<sub>2</sub>O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (7/3/1)

## ❖ Chromatogramme 3

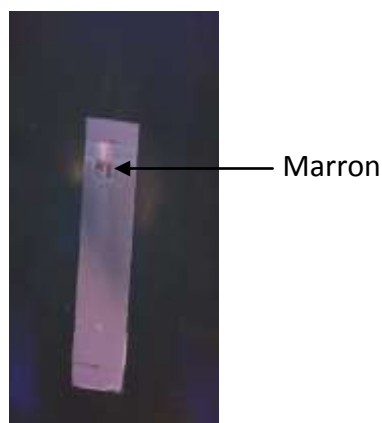


Figure III-15 : CCM par H<sub>2</sub>O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1.5/2/0.1)

Tableau III-3 : Valeurs de Rf de l'extrait d'acétate d'éthyle

Le système utilisé	Les taches	H	h	Les valeurs de Rf (cm)
Toluène/EtOH/méthyl éthyle Céton (4/3/3)	Bleu	4,5	4,4	0,9
	Jaune	4,5	3,2	0,71
	Marron	4,5	1,9	0,42
H <sub>2</sub> O/MeOH/méthyl éthyl céton (7/3/1)	Jaune fonçais	5	4,6	0,92
	Jaune claire	5	3,3	0,66
	Bleu	5	1,8	0,36
	Rose	5	0,4	0,08
H <sub>2</sub> O/BuOH/EtOH/acide acétique (3/1,5/2/0,1)	Marron	6	5,2	0,86

## III.9.3. Pour l'extrait de n-Butanol

## ❖ Chromatogramme 1

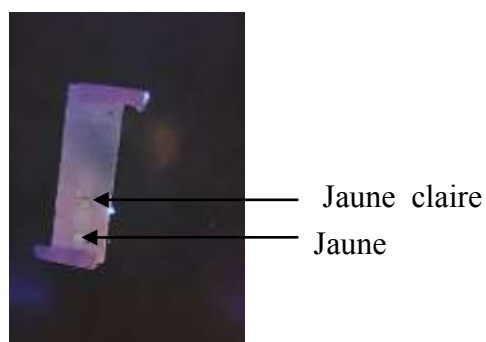
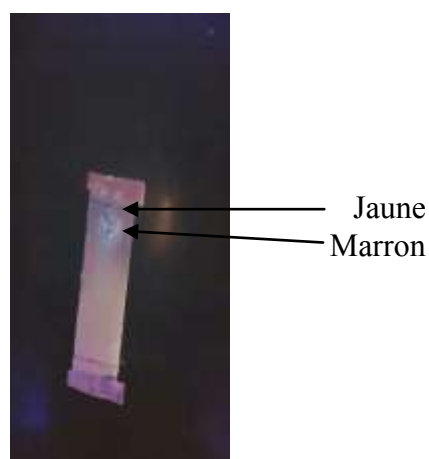
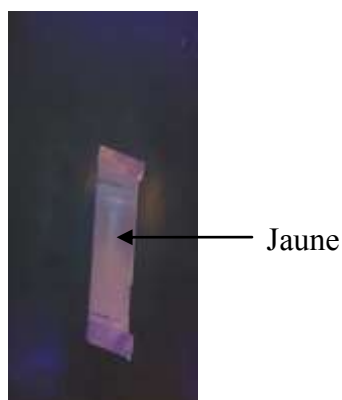


Figure III-16 : CCM par Toluène/Ethanol/Méthyl éthyl céton (4/3/3)

## ❖ Chromatogramme 2:

Figure III-17 : CCM par H<sub>2</sub>O/Méthanol/Méthyl éthyl cétone (7/3/1)

## ❖ Chromatogramme 3 :

Figure III-18 : CCM par H<sub>2</sub>O/Butanol/Ethanol/Acide acétique (2/1.5/2/0.1)Tableau III-4 : Valeurs de R<sub>f</sub> de l'extrait de n-Butanol

Le système utilisé	Les taches	H	h	Les valeurs de R <sub>f</sub> (cm)
Toluène/EtOH/méthyl éthyl cétone (4/3/3)	Jaune claire	4,6	1,5	0,32
	Jaune	4,6	0,1	0,02
H <sub>2</sub> O/MeOH/méthyl éthyl cétone (7/3/1)	Jaune	4,5	4	0,8
	Marron	4,5	3,8	0,84
H <sub>2</sub> O/BuOH/EtOH/acide acétique (3/1,5/2/0,1)	Jaune	4,5	3,8	0,8

### III.10. Discussion des résultats

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

- ✓  $0,00 \leq Rf \leq 0,25$  : Les polyhydroxyflavones.[99]
- ✓  $0,3 \leq Rf \leq 0,5$  : Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones .[99]
- ✓  $0,5 \leq Rf \leq 0,75$  : Les flavonones, les flavonols et les méthoxyflavones.[99]

Donc :

Pour l'extrait chloroformique ,l'extrait acétate éthylique et l'extrait n-butanol le meilleur système : H<sub>2</sub>O /BuOH /EtOH /Acide acétique (3/1,5 /2 /0,1) ,parce qu'il donnent une meilleurs séparation .

### III.11. Etude de l'activité antibactérienne *In-vitro* des extraits chloroforme, Acétate d'éthyle et n-Butanol

#### III.11.1. Définition

Les bactéries sont des micro-organisme Unicellulaires ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope Optique à l'état frais ou après coloration. Leurs forme peut être sphérique (cocci) ou bâtonnet (bacilles) incurvée(vibrions) ou spiralée(spirochètes).

#### III.11.2. Description des bactéries étudiées

##### ❖ *Listeria monocytogene*

Ce sont des bacilles Gram positif, extrémités arrondies, non sporulés, mobile à 20-25 °C. Elles sont des germes ubiquitaires, très résistantes au milieu extérieur et sont aussi des hôtes des êtres vivants[100]. Leur voie de transmission vers l'homme est principalement la voie alimentaire. *Listeria monocytogene* est responsable de trois d'infection chez l'homme : Listériose de l'adulte et de l'enfant (méningo-encéphalites, septicémie), et Listériose de la femme enceinte (infection bénigne)[101].



#### ❖ *Escherichia coli*

Ce genre appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm [102]. Les entérobactéries sont les plus hôtes du tube digestif de l'homme et les animaux, mais aussi de nombreuses souche de cette famille ont été isolée de l'environnement aquatique ou terrestre, les bactéries de cette famille cultive facilement sur les milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organique simples comme source d'énergie : sucres, acides aminés, acide organiques, ce genre est responsable d'infections intestinales (gastro-entérites, diarrées et aussi des infections du tractus urinaire)[103].

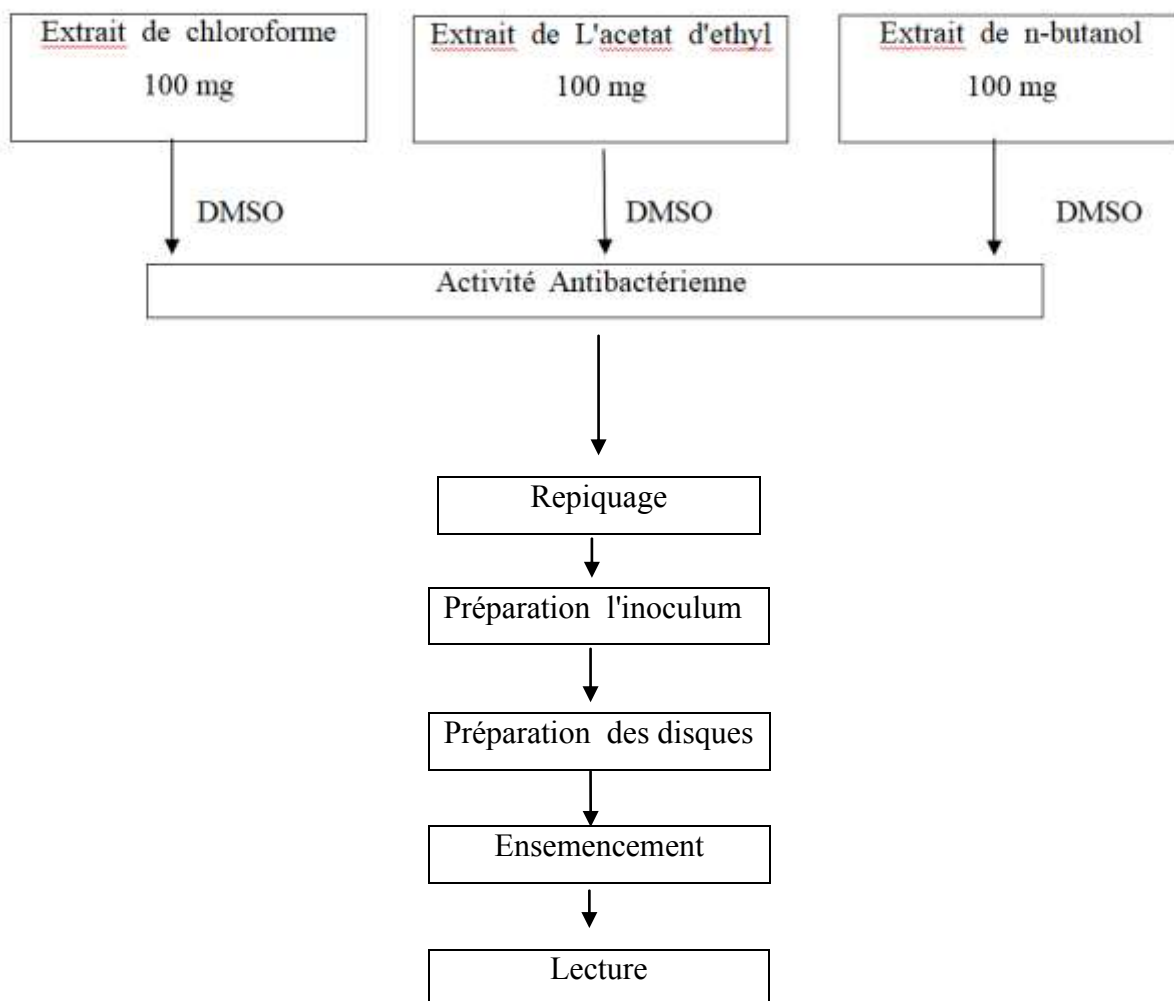
#### ❖ *Bacillus cereus*

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chainettes courte[104]. *B. cereus* est anaérobie facultatif, mobile et capable de former des endospores, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre. *B. cereus* est anaérobie facultatif, mobile et capable de former des endospores, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre. [105]. Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, la température optimale étant d'environ 37 °C[106]. Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches. [107]

### III.11.3. Etude de l'activité antibactérienne

Cette activité antibactérienne à été effectuée au laboratoire de bactériologie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA) selon le plan représenté par la figure (III-19), Biskra (Algérie) sur les souches bactériennes pathogènes suivantes :

*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*.



**Figure III-19 :** Plan général de la partie Antibactérienne.

#### III.11.4. Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme).

Les extraits préparés (100 mg) sont dilués dans le DMSO (1 ml). Par ce que est un solvant préconisé par la majorité des auteurs qui ont prouvé qu'il n'a aucun pouvoir antibactérien puissant et avec l'agitation à laide de l'appareil vortex 3 qui est représenté par la figure (III-20).



**Figure III-20** : Appareil vortex 3

Le principe de cette méthode, consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose. La sensibilité des souches aux extraits de la plante a été réalisée par la technique, *in vitro*, de diffusion en milieu gélosé, ou méthode des disques [108].

Cette technique consiste à introduire le germe que l'on veut étudier à la surface du milieu gélosé (Muller Hinton), contenu dans des boites de pétri sur une épaisseur de 4 mm puis, on applique des disques imprégnés de substance chimique que l'on veut tester. On aperçoit les substances diffuses dans la gélose avec une forme circulaire. Après 18-24 heures, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition [109].

#### **a) Repiquage des espèces bactériennes**

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

#### **b) Préparation de l'inoculum**

Pour préparer l'inoculum, on racle 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 18h, sur le milieu d'isolement puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile (5ml). La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex.

**c) Préparation des disques**

Dans cette étude, on a utilisé le papier Wattman N°3, coupé en disques de 6 mm. Ces disques doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Ces derniers, une fois préparés, sont placés dans une boîte de pétri (en verre) contenant 10 ml d'eau distillée et auto clavés pendant 20 mn à 120°C [110].

**d) Ensemencement**

Des boîtes de pétri stériles, préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre, contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37°C [110].

**e) Lecture**

Après la culture, la lecture s'effectue en mesurant sur chaque disque le diamètre d'inhibition du principe actif. Cette distance millimétrique est ensuite reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprété sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié [111].

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des l'extrait étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition et selon les critères suivants [112-113].

-Non sensible (-) pour  $\varnothing < 8$  mm;

-Sensible (+) pour 9-14 mm;

-Très sensible (++) pour  $\varnothing$  15-19 mm

-Extrêmement sensible (+++) pour  $\varnothing > 20$  mm.

### III.11.5. Résultats et discussion

-L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition.

-Les résultats obtenus après 24h d'incubation à l'étuve à 37 °C (tableau 13).

-Le diamètre de la zone d'inhibition variant de 7 à 12 mm, diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

**Tableau III-5 :** Zone d'inhibition en mm des extraits de *Teucrium polium* sur les souches bactériennes testées.

(chloroformique, acétate d'éthyle, et n-Butanolique )

Les bactéries / Les extraits	E CHCl <sub>3</sub>	E AcOEt	E ButOH	T+ Gentamicyne
<b>Listeria mono cétogène</b>	D 12 S +	7 -	7 -	33 +++
<b>Echechiria coli</b>	D 00 S -	00 -	00 -	30 +++
<b>Bacilles Serrus</b>	D 9 S +	7 -	00 -	33 +++

**D :** diamètre de la zone d'inhibition

**S :** Sensibilité.: (-) Résistante , (+)Sensible, (+++)Très Sensible.

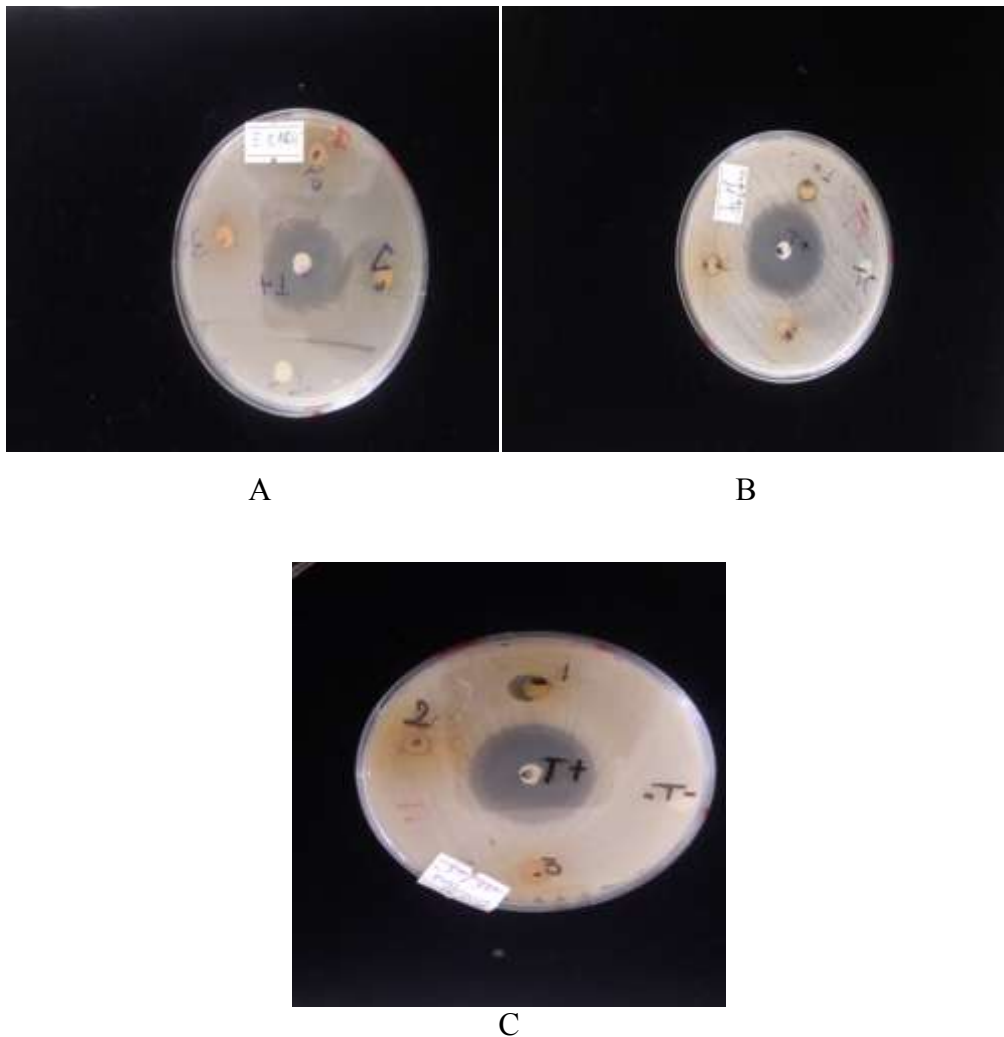
#### Discussion :

Les extraits chloroformique, acétate d'éthyle, et Butanol donne un résultat négatif(-) sur un diamètre de la zone d'inhibition (00 mm) vis-à-vis **EC**

L'extrait chloroformique donne un résultat clair et positif(+) sur un diamètre de la zone d'inhibition (9-12 mm) vis-à-vis **LM**, et **Bacilles Serrus**.

Une faible réactivité est présentée par l'extrait d'acétate d'éthyle vis-à-vis **LM**, **Bacilles Serrus**, et aussi l'extrait de n-butanol donne une faible réactivité vis-à-vis **LM**. Ceci peut s'expliquer par leur richesse en composés les moins actifs.

Les résultats de ce travail ont démontré que la plante *Teucrium polium* présente un potentiel antimicrobien contre les bactéries testées.



**Figure III-21** : Antibiogramme des extraits Préparés : **A.** Bactéries Escherichia coli. **B.** Bactéries Listeria mono cétogène. **C.** Bactéries Bacilles Serrus.

### *Conclusion générale*

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants et des antimicrobiens naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

Dans ce travail, nous avons réalisé une étude phytochimique sur les feuilles de la plante *Teucrium polium* qui appartient à la famille Lamiacées. Notre collaboration à l'étude de cette plante consiste à détecter et étudier les effets Biologiques des flavonoïdes de cette plante médicinale, qui constituent une grande classe de produits naturelles.

L'extraction de ces métabolites secondaires basée sur leur solubilité dans plusieurs solvants organique de polarités différentes a été avec le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Nous avons étudié trois extraits : l'extrait chloroformique , l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol.

D'autre part, les tests de chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits Obtenus en utilisant plusieurs systèmes de solvants, a permis d'avoir une multitude de Taches ce qui prouve la richesse des extraits en substances actives essentiellement les Poly phénols (flavonoïdes).

Pour l'évaluation du potentiel antibactérien *in vitro* de nos extraits, nous avons préféré de les tester contre plusieurs bactéries telle que *Listeria mono cétogène*, *Escherichia coli*, et *Bacille séreuse* selon la méthode des disque (antibiogramme), cet étude a montré que notre plante aune bonne activité antibactérienne surtout contre Listéria mono cétogène et Bacille séreuse pour l'extrait chloroforme.

## Référence bibliographique :

- [1] Diallo, Amadou. "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae)." *PhD. of the University Bamako, Mali* (2005): 38-47.
- [2] Miura, Kayoko, Hiroe Kikuzaki, and Nobuji Nakatani. "Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method." *Journal of agricultural and food chemistry* 50.7 (2002): 1845-1851.
- [3] Guillen, M. D., and M. J. Manzanos. "Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant." *Food Chemistry* 63.3 (1998): 373-383.
- [4]. H. Sasaki, H. Nishimura, T. Morata, M. Chin, H. Mitsuhashi, Y. Komatsu, H. Maruyama, T. Guo-rui, H. Wei, X. Yu-Long, *Planta Med.*, 1989, 55, 458
- [5] Kabouche, Ahmed. "Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae." (2005).
- [6] Ismailoglu, U. B., et al. "Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings." *Journal of ethnopharmacology* 79.2 (2002): 193-197.
- [7] Kamel, Mohamed S., et al. "Iridoid and megastigmane glycosides from *Phlomis aurea*." *Phytochemistry* 55.4 (2000): 353-357.
- [8] Sarkhail, Parisa, et al. "Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes." *Pharmacological Research* 56.3 (2007): 261-266.
- [9] Wagner, H. K., and Peter Maria Wolff, eds. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological Or Therapeutical Activity: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section A, Held at the University of Munich, Germany, September 6–10, 1976*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [10] T. A. Geissman, and D.H. Crout, G , 1969.Organic Chemistry of Secondary Plant



Metabolism. California : Freeman, Cooper and company.

[11] S. Ruzsnyák, et A Szent-Gybrgyi. Vitamin P : Flavonols as vitamins. Nature.

P.798. université du québec à montréal

[12] S. Ruzsnyák, et A Szent-Gybrgyi . Vitamin P : flavonols as vitamins. Nature. P.

798. Université du québec à montréal. C.A.

[13] Williams, R.J. Mayer, 2004. Anthocyanins and other flavonoids. P.539-573.

[14] Beecher G. R, (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J. Nutri., 133(10), 3248S-3254S .

[15] Kueny-Stotz M, (2008). Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctora en chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France. P54.

[16] Hollman, P.C.H ; van Trijp, J.M.P. Buysman, M.N.C ; Gaag, P.M ; Mengelers, M.J ; de vries, J.H; Katan, B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoïde quercetin from various foods in man. FEBS lett. 1997, 418 : 152-156.

[17] Bruneton .J.B: pharmacognosie, phytodynamie ; plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> ed. la reoisier, paris, p503, 1993.

[18] Jean Bruneton, pharmacognosie phytochimie plante médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, 1993

- [19] Mohammadi. Z. 2006. Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plants de la région de Tlemcen. Dip de magister de biologie, Tlemcen 105p.
- [20] Ono, Masamichi, et al. "Clinical outcome of patients 20 years after Fontan operation—effect of fenestration on late morbidity." *European journal of cardio-thoracic surgery* 30.6 (2006): 923-929.
- [21] Bruneton . J.B : pharmacognosie, phytodynamie ; plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> ed. la reoisier, paris, p503, 1999.
- [22] Clous D.D et Koenig. O . 2006. New book of herbs pp 49-50.
- [23] Hellal. Z. 2010. L'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardina (serdina pilchardus) Univer Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou. Mém de fin d'étude pour l'obtention d'un dip magister en biochimie appliquée et biochnologies.8p
- [24] HOPKINS., (2003). Physiologie végétal, 2<sup>ème</sup> édition. Boeck, pp: 276-280.
- [25] Yang J., Guo J., and Yuan J, (2008). In vitro antioxydant properties of rutin. *LWT*. 41: 1060-1066. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- [26] Abou El Hassan, M. A. I.; Touw, D.J.; Wilhelm, A. J.; Bast, A.; van der Vijgh, W.J.F., Stability of mono HER in an aqueous formulation for i.v. administration. *International Journal of pharmaceutics* 2008, 211, (1-2), 51-56.
- [27] Calias, P. et al 1996 ; et Pulley, G. 1936 ; Benvente-Garcia etal. 2001.
- [28] Walle, T., Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, 36, (7), 829-837.

[29] Lee, S. J.; Kim, J. -C. ; Kim, M. J.; Kitaoka, M.; Park, C. S.; Lee, S. Y.; Ra, M.-J.; Lubinic.E. 2003.toxicologie industrielle et intoxications professionnelles . 4<sup>ème</sup> édition. MASSON. 85p

[ 30 ] Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P., Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004, 35,(2), 379-387.

[31] Calias, P.; Galanopoulos, T.; Maxwell, M.; Khayat, A.; Graves, D.; Antoniadis, H.;d'Alarcao, M., Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. Carbohydrate Research 1996, 292, 83-90.

[32] Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Luisa Pelegrino, M.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F .P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F., ' In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2003, 56, (2), 167-174.

[33] Perrier, E.; Mariotte, A. M.; Boumendjel, A.; Bresson-Rival, D. Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmetique, dermopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. FR2778663-A1, 1998.

[34] Sakai, M.; Suzuki, M.; Najo, F.; Hara, Y. 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP0618203 , 1994.

[35] Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S., Enzymatic synthesis and Antioxidant Properties of Poly (rutin). Biomacromolecules 2003, 4, (5), 1394-1399

[36] Fargrix, D. Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon ,2000 .

[37] Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calaboro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P., Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 35, (2), 379-387.

[38] Fargrix (2000), Barhaeset al (2000), Balogh-hergovichet Speier (2001), Mochizukiet al. (2002), Ramos-Tejadaet al. (2002).

[39] Ahmad, Asif, et al. "Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review." *Food Research International* 77 (2015): 221-235.

[40] Texte de conférence du 5<sup>ième</sup> Colloque sur les produits naturels d'origine végétale -8 aout 2001 – Université Laval, Qc; Canada. <<Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux >>

[41] G. (Joe) Mazza. Programme de rechrces alimentaires, Agriculture et agroalimentaire Canada Numéro spécial du *Journal of Food Science and Agriculture*, 2000, vol. 80 n°7

[42] Burda, S.; Oleszek, W.; Antioxydant and antiradicalactivities of flavonoïdes; *J. Agric Food Chem.* 2001 Juin; 49 (6):2774-9.

[43] Unité des Maladies Métaboliques et des Micronutriments, INRA de Clermont.

[44] Ferrand/Theix 63122 Saint Genès Champanelle. Absorption et métabolisme splanchnique des flavonoïdes chez le rat.

[45] Marie-Claude Martini, Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie page 331 (ISBN : 2743005912). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 3<sup>e</sup> Ed.) BRUNETON Jean ...

[46] Esmaeili et Yazdanparast, 2004 Hypoglycaemic effect of Teucrium polium: studies with rat pancreatic islets. Journal of Ethnopharmacology. 95 (2004).

[47] Rasekh et al., 2001 ;Shahraki et al., 2006

[48] I. Deslauriers, 2000, Food sciences, Université McGill.

[49] J.B. Harborne, H. Baxter, 1999. The handbook of Natural flavonoides, p214. Livre : Phytochemical Analysis.

[50] ferreres. F. and tomas. F , 1980. Flavonoids in subtribe Centaureinae of Asteraceae family. University of Palermo . P 294-301..

[51] H.Milane ,2004.La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libre ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de louis pasteur .P : 13-36.

[52] J.B. Harborne, H. Baxter, 1999. The handbook of Natural flavonoids, p214. Livre :phytochemical Analysis. Et/H. Milane, 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libre ;études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de louis pasteur . P: 13-36.

[53] j.Bruneton, 1993. Pharmacognosie ,phytochimie et plantes médicinales. La voisier DOC Paris. 2<sup>e</sup>me édition. P. 268-277.

[54] j.Dwyer, et j.j. Peterson, 2002. Measuring flavonoid intake: need for advanced. P. 925-930. Journal: positron emission tomography in food sciences.

[55] P. Hollman, et M.B. Katan, 1999. Dietary flavonoids : intake. Health effects and bioavailability . P 937-942..

[56] M.B. Katan, 1999. Dietary flavonoids : intake. Health effects and bioavailability. P 937-942..

[57] C.A. Williams, et R.J. Gmyer. 2004. Anthocyanins and other flavonoids .P.539-573./H.M.Merken, et G.R.Beecher,2000. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones .P.577-599.

[58] Van Acker S.A.B.E ; D.J. Ven den Berg Tromp M.N.J. L, D.H. Griffioen van Bennis, W.P. Van der Vijgh W.J.F. A Bast, 1996. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids .P 331-342.

[59] G.A Cooper-drive; M Bhattacharya ; 1998. Role of Phenolics in plant Evolution. Phytochemistry. P 1165-1174. Institute of Forest utilization and Forest Technology.

[60] Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition. 3, Lavoisier, Paris.

[61] Ayad, Radia. "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce." (2008).

[62] J. Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetables, Edition Dunod, Paris

[63] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetables, Edition Dunod, Paris.

**[64] Benabdallah Hassiba, (2016).** Cours Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Université Ferhat Abbas de Sétif, p37.

**[65] Markham, K.R. (1982).** Technique of flavonoides identification, Academic press, London .

**[66] Mabry , T;J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.  
ETBerthillier, A. (1972). La chromatographie et ses application ,Dunod paris.

**[67] Markham, K.R. (1982).** Technique of flavonoides identification, Academic press, London.

**[68] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.

**[69] Harborne, J.B. (1975).** Flavonoids in phytochemistry, Vol. II, Edition Lawrence, P.L., Vol. II, LittonEducationalPublishing.

**[70] Jurd, L. and Horowitz, R. (1962).** Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.

**[71] Hansel. W. Les plantes médicinales.**Delachaux et Niestlé SA, Paris. 100p.

**[72] Markham, K.R. (1982).** Technique of flavonoides identification, Academicpress, London.

**[73] MABRY, T.J. MARKHAM, K.R, THOMAS, M.B. the systematic identification of flavonoids springer verlag NEW YORK (1979).**

[74] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetables, Edition Dunod, Paris.

[75] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.

[76] Markham, K.R. (1982). Technique of flavonoides identification, Academicpress, London.

[77] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.

[78] Nielsen, J.G. and Moller J. (1970). Acta Chem. Scand., 24, 2665.

[79] WILSON, R.G., BOWIE, J.H; et WILLIAMS, D.H. (1986). *Tetrahedron*, 24, 1407.

[80]. **Abdallah , Sahki. R.** Le Hoggar promenade botanique, espèces herbacées ; Edition Esope, (2004).

[81] Ozenda, P. "Flore du Sahara. 3 ème Edition." *CNRS, Paris. 662p* (1991).

[82]. **77 Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasulo, M.P;, Lembo, M. Mascolo N.,Menghini A..** Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L) Pharmacol. L Res. Commun. 1: 16. **1984.**

[83]. **Rasekh, H.R., Yazdanpanah, H., Hosseinzadeh, L., Bazmohammadi, N.,Kamalinejad, M.** Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 4: 245-249. **2005.**



**[84]. Quezel. P, Santa. S., (1963).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Es. C.N.R.S, Ed. Paris, p. 1165.

**[85]** Amrani, Samira. "The Holocene flora and vegetation of Ti-n Hanakaten (Tassili n'Ajjer, Algerian Sahara)." *Plants and People in the African Past*. Springer, Cham, 2018. 123-145.

**[86]** Fettah, Asma. *Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante Teucrium polium L. sous espèce Thymoïdes de la région Beni Souik, Biskra*. Diss. UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA, 2019.

**[87]. Abdallah H. and Sahki R., (2004).** Le Hoggar promenade botanique. Espèces herbacées. Edition Esope, p.311.

**[88]. STELLA S, PREDRAG L, ARIEH B. 2010.**

The Effect of an Aqueous Extract of *Teucrium polium* on Glutathione Homeostasis Possible Mechanism of Its Hepatoprotectant Action.

*Advances in Pharmacological Sciences, 10:1-7.*

**[89]. LAGNIKA L. 2005.**

Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises.

*Thèse Doctorat en Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg. 247 Pages*

**[90] KAMEL A, SANDRA P. 1994.**

Gas Chromatography-Mass spectrometry analysis of the volatile iols of two *Teucrium Polium* varieties.

*Biochemical Systematic and Ecology, 22(5): 529-532.*

**[91] KAWASHTY SA, GAMAL EL-DIN EM, SALEH NAM. 1997.**

The favonoid chemosystematics of two Teucrium species from Southem Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 657-660.

**[92] HASSANI P, YASA N, VOSOUGH-GHANBARI S, MOHAMMADIRAD A, DEGHAN G, ABDOLLAHI M. 2007.**

In vivo antioxidant potential of Teucrium polium, as compared to a-tocopherol.

*Acta Pharm*, 57: 123-129.

**[93] BEZIC N, VUKO E, DUNKIC V, RUSCIC M, BLAZEVIC I, BURCUL F. 2011.**

Antiphytoviral Activity of Sesquiterpene- Rich Essential Oils from Four Croation Teucrium Species.

*Journal of molecules*, 16 : 8119-8129

**[94]** Ismaeili, M.A.; Yazdanparast, R.2004; Ardestani et Yazdanparast, 2007; Rasekh et al, 2001; Ricci et al ,2005; Hasani et al, 2007)

**[95]** Markham, Ken R., and V. Mohan Chari. "Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids." *The flavonoids*. Springer, Boston, MA, 1982. 19-134.

**[96]** <http://fr.shvoong.com/exact-sciences/chemistry/1985414>

chloroforme/ ixzz2Sdgwipzf

**[97]** Rozenberg, Valeria, et al. "An improved synthesis of (S)-(+)-and (R)-(-)-[2.2] paracyclophane-4-carboxylic acid." *Tetrahedron: Asymmetry* 9.4 (1998): 653-656.

**[98]** Ounis, Romaissa, Djamila Boumaza, and Saida Karouche. "Evaluation du contenu phénolique et des activités biologiques de Teucrium polium." (2018).

**[99]** Mme Djoualla Sarra, Etude phytochimique de la plante *Anastatica Hierochuntica*,; *Activités biologiques*, 2014-2015.

[100] Guérin-Faublée, V., and G. Carret. "L'antibiogramme: principe, méthodologie intérêt et limites." *Journées nationales GTV-INRA* (1999): 5-12.

[101] Yu R. **Mandiekar**. S Tony-Kong. A-N (2000). Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole induced toxicity. Induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular Pharmacology*. 58: 431-437.

[102] **Sanchez-Moreno C** , (2002), Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems: international journal of Food Science and Technology 8; p 121-137.

[103] **Heller W. Forkmann G**. The flavonoides advances in research since 1989. Chapman & Hall 1993. 499-535.

[104] **Logan, N. A., & Rodriguez-Diaz, M.** (2006). *Bacillus spp. And Related Genera*. In S; H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 139-158). West Sussex, England, UK : John Wiley and Sons Ltd., P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J, H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (Eds.). (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th end.) American Society of Microbiology Press.

[105] **Logan, N. A., & Rodriguez-Diaz, M.** (2006). *Bacillus spp. And Related Genera*. In S. h. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 139-158). West Sussex, England, UK ; John Wiley and Sons Ltd.

[106] **From, C G**, (2004). Enteric infections and Food Poisoning. In K. J. Ryan,& C. G. Ray (Eds.), *Sherris Medical Microbiology*. (4th ed ., pp. 857-865). USA ; McGraw Hill

[107] From, C., PuKall, R., Schumann, p., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* SPP. Outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1178-1183. Doi : 10.1128/AEM.71.3.1178-1183.2005

[108] Guérin-Faublée, V., and G. Carret. "L'antibiogramme: principe, méthodologie intérêt et limites." *Journées nationales GTV-INRA* (1999): 5-12.

[109] **Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T.,Baser K.H.C., (207).** Antimicccccccccccrobal activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100; pp: 553-559.

[110] Adesokan, Ayoade Abdulfatai, Musbau Adewumi Akanji, and Musa Toyin Yakubu. "Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark." *African Journal of Biotechnology* 6.22 (2007).

[111] Le Houérou, Henry N. "Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara." *Journal of Arid Environments* 48.2 (2001): 103-128.

[112] Ponce, A. G., et al. "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard." *LWT-Food Science and Technology* 36.7 (2003): 679-684.

[113] Elhoussine, D., B. Zineb, and B. Abdellatif. "GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco." *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6.3 (2010): 191-198.

## ***Résumé***

Dans notre travail phytochimique, on a étudié les parties aériennes de la plante *Polium Teucrium* qui appartient à la famille des << Lamiacées >>, un genre connu pour sa richesse en flavonoïdes.

On a employé les diverses méthodes courantes d'extraction telle que la macération, la Chromatographie sur couche mince (CCM), cette dernière nous a permis de détecter quelques composés organiques dont leurs coloration sont : marron, jaune, bleu,....., et d'après leurs Rf sont caractéristiques des flavonoïdes.

D'une autre part l'étude biologique a montré que l'extrait chloroformique possède une activité anti bactérienne sur les souches testé (*Listeria monocytogène*, et *Bacille Serrus*).

## ***Abstract***

In our phytochemical work, we studied the aerial parts of the *Polium Teucrium* plant which belongs to the family of <<Lamiaceas >> genus known for its richness in flavonoids.

The various common methods of extraction were employed such as maceration, thin layer chromatography (TLC). The latter allowed us to detect some organic compounds whose coloring is; brown, yellow, blue....and according to their RF are characteristic of flavonoids.

Auth On the other hand, the biological study showed that the chloroform exact has antibacterial activity on the strains tested (*Listeria monocytogène* and *Bacillus Serrus*).

## **ملخص**

في هذا البحث قمنا بدراسة الأجزاء الهوائية لنبتة الخياطة من عائلة ( لاميا سي ) المعروفة باحتوائها

على الفلافونويدات وقد استعملنا لهذا الغرض طرق الاستخلاص: النقع وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

اذ تم كشف مركبات عضوية ذات اللون: بنية وصفراء وزرقاء والتي هي عبارة عن فلافونيدات.

كما اثبتت الدراسة البيولوجية ان مستخلص الكلوروفورم يملك فعالية مضادة لانواع البكتيريا المدروسة

(ليستيريا مونو سيتوجان و باسيل سيروس).