



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :  
N° de série :

Faculté des Sciences et Technologies  
Département des Sciences et Technologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## MASTER

**Domaine :** *Sciences et Technologies*

**Filière :** Génie des procédés

**Spécialité :** Génie chimique

**Par :** Romaissa Oulad haddar  
Siham Nouacer

## Thème

**Contribution à la purification et la caractérisation chimique de quelques principes actifs de l'extrait hydroalcoolique de *Cymbopogon schoenanthus* de la région de Ghardaïa**

Soutenu publiquement le : .../.../.....

Devant le jury :

<b>Ladjal Boumediene</b>	MAA	Univ. Ghardaïa	<b>Président</b>
<b>Adamou Youcef</b>	MAA	Univ. Ghardaïa	<b>Examineur</b>
<b>Baba arbi Ilias</b>	MAA	Univ. Ghardaïa	<b>Examineur</b>
<b>Hellali Naima</b>	MCB	Univ. Ghardaïa	<b>Encadreur</b>

Année universitaire 2017/2018

A decorative border of pearls and roses surrounds the text. The top and right sides feature a row of pearls, while the left and bottom sides feature a row of roses. The roses are in various stages of bloom, with some showing green buds and others fully open with white petals. The pearls are arranged in a slightly irregular pattern, creating a classic, elegant frame.

## DÉDICACE

*Je dédie mon travail à :*

*Mes chers parents pour leur amour inestimable,*

*leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices*

*et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*Mes sœurs Kastum, fatima, houda, hanaa, batoul.*

*Mes frères bohafes, mohamad, Surtout karime pour*

*leur soutien moralement .*

*Toutes mes amies.*

*Je dédie mon travail aussi à :*

*Toute me famille « Oulad haddar » « Laouar »*

*Chaleureuse qui nous a réuni dans se travail.*

*Remaissaà*

A large, detailed illustration of a white rose with green leaves and water droplets, positioned in the bottom right corner of the page.

A decorative border of pearls runs along the top, bottom, and right sides of the page. On the left side, there are several roses, including a red one and several white ones with green leaves and buds.

## DÉDICACE

*Je dédie mon travail à :*

*Mes chers parents pour leur amour inestimable,*

*Leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices*

*Et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*Mes sœurs massouda, taldja, khaira, Hayat, om al  
khaira, zohra, Safiha, Aïcha, Mariam;  
mabrouka, roukaia.*

*Mes frères kaddour, Rabah, Abo Baker Surtout  
mon marie pour leur soutien moralement.*

*Toutes mes amies.*

*Je dédie mon travail aussi à :*

*Toute me famille « nouacer » « mellsakhe »*

*Chaleureuse qui nous a réuni dans ce travail.*

*Siham*

A large, detailed white rose with green leaves is positioned in the bottom right corner of the page.

# *Remerciement*

*En préambule à ce mémoire, nous remercions  
ALLAH qui l'aide et nous donne la patience et  
le courage durant nos années d'étude.*

*Tout le respect et les mots de remerciement encadreur  
"HELLALI NAÏMA " pour son soutien, son aide,  
ses conseils directifs, et son suivi durant la réalisation  
de ce mémoire de fin d'étude.*

*Nous remercions membres de jurys et les étudiants  
du département de science et technologie de  
d'université de Ghardaïa.*

*Nous remercions également toute personne ayant  
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail.*

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude.....	29
<b>Tableau 2:</b> Systèmes solvants utilisés pour la CCM gel de silice.....	33
<b>Tableau 3 :</b> différent éluant testé pour CCM gel de silice.....	33
<b>Tableau 4:</b> Différent éluant testé pour CCM poly amide.....	34
<b>Tableau 5:</b> Nature des composés a séparé par CCM.....	36
<b>Tableau 6 :</b> Couleurs et rendements des extraits obtenus.....	39
<b>Tableau 7:</b> Relation entre structure et couleur de flavonoïdes.....	39
<b>Tableau 8:</b> Relation entre le Rf et les structures des flavonoïdes.....	40
<b>Tableaux 9 :</b> Rf et couleur des taches des extré éluant hexane /acétate éthyle déf % sur CCM gel de silice.....	40
<b>Tableaux 10:</b> Rf et couleur des taches des extré déf éluant sur CCM gel de silice.....	42
<b>Tableaux 11:</b> Rf et couleur des taches des extré éluant Toluène /MEOH déf % sur CCM de poly amide.....	43
<b>Tableau 12:</b> affinité des extrés avec défèrent éluant sur CCM gel de silice.....	45
<b>Tableau 13 :</b> couleur La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle.....	46
<b>Tableau 14:</b> nombre de fraction et sa couleur.....	46
<b>Tableau 15 :</b> fraction avec sa logue max d'onde.....	47

# Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> <i>Cymbopogon schoenanthus (L.) spreng</i> .....	8
<b>Figure 02:</b> Structure de quelques alcaloïdes .....	11
<b>Figure 03:</b> Squelette de base des flavonoïdes.....	12
<b>Figure 04 :</b> structure chimique générale des flavonoïdes.....	13
<b>Figure 05:</b> Structure de quelques tanins.....	14
<b>Figure 06:</b> structure chimique de coumarine.....	14
<b>Figure 07:</b> Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes.....	15
<b>Figure 08 :</b> Structure de la molécule d'isoprène.....	16
<b>Figure 09 :</b> System soxhlet.....	19
<b>Figure 10:</b> Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	21
<b>Figure 11 :</b> Plaque chromatographique éluee permettant le calcul du Rf.....	24
<b>Figure 12:</b> Cristalliseurs à refroidissement par contact direct.....	25
<b>Figure 13 :</b> Evaporateur rotatif .....	30
<b>Figure 14 :</b> Extraction liquide- liquide .....	31
<b>Figure 15 :</b> Séchage de l'extrait par Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	32
<b>Figure 16 :</b> Schéma mode d'extraction solide et fractionnement.....	33
<b>Figure17 :</b> Teste de CCM pour des extrés éluant hexane /acétate d'éthyle.....	34
<b>Figure18 :</b> lampe UV VL-4.L.....	36
<b>Figure 19 :</b> La spectrophotométrie UV-visible 40 pour fraction 2.....	46

# Abréviations

**CCM** : chromatographie sur couche mince.

**CC** : chromatographie sur colonne.

**Mext**: la masse de l'extrait après évaporation du solvant.

**Méch**: la masse sèche la plante.

**Rf** : Rapport frontal.

**FR** : fraction (extrait).

**MEOH** : méthanol.

**UV** : ultras violet.

**Acet** : acétate d'éthyle.

**n-bt** : n-butanol.

**HES** : huiles essentielles.

# Sommaires

Liste des tableaux .....	A
Liste des figures.....	B
Abréviation .....	C

## **Partie Théorique**

### **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

I. Les plantes médicinales.....	5
I.1. Définition.....	5
I.2. L'origine des plantes médicinales.....	5
I.3. Utilisation.....	6
I.4. Les différentes modes de préparation des plantes.....	7
I.5. Généralité sur <i>Cymbopogon schoenanthus</i> .....	8
I.5.1. Description botanique.....	8
I.5.2. Position systématique.....	8
I.5.3. Utilisation.....	9
I.6. Les métabolites des plantes médicinales.....	9
I.6.1. Les métabolites premières.....	9
I.6.2. Les métabolites secondaires.....	10

### **Chapitre II : les différent technique de extraction et séparation et purification**

II.1. Généralité sur l'extraction.....	21
II.2. procédés d'extraction.....	21
II.3. La purification .....	26
II.3.1. La chromatographie .....	26
II. 3.2. La cristallisation .....	28
II.4. Méthode de l'identification .....	29

## **Parti pratique**

### **Chapitre III : Matérielle et méthode**

III.1. La récolte.....	33
III.2. Conservation des échantillons.....	33
III.3. Extraction et fractionnement des principes actifs.....	33
III.4. Analyse chromatographique des extraits par CCM.....	36
III.4.1.Principe.....	36
III.4.2.Protocole de CCM sur gel de polyamide.....	38

III.4.3. Mode opératoire.....	39
III.4.4. L'analyse des résultats obtenus par la CCM.....	39
III.4.5. La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnel.....	40
III.4.6. Chromatographie sur micro colonne.....	40
III.4.7. Techniques d'identification structurale.....	41

#### **Chapitre IV : Résultat et discussions**

IV.1. Extraction des flavonoïdes.....	44
IV.2. Diagnostic par CCM analytique.....	44
IV.3. Etude dès l'extrait par différentes méthodes chromatographiques.....	45
IV.3.1. Chromatographie sur couche mince CCM.....	45
IV.3.2. La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle.....	50
IV.3.3. Chromatographie sur micro colonne.....	51
IV.4. La spectrophotométrie UV-visible.....	51

# Résumé

*Cymbopogon schoenanthus*, connue sous le nom vernaculaire "lamade" est une plante médicinale très répandue dans le sud algérien de la famille des Poaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle. L'extrait méthanolique brut a été obtenu par l'extraction par macération (EM), en utilisant le méthanol comme un solvant/eau 70/30 % (v/v).

Les rendements des fractions obtenus (éther de pétrole, acétate d'éthyle, dichlorométhane, n butanol, sont: 1,04 % et 1,06 % et 1,045 % et 1,61%.

Les composés des fractions isolés ont été séparés par différentes techniques:

- La chromatographie analytique sur couche mince CCM sur gel de silice.
- La chromatographie analytique sur couche mince CCM sur gel de polyamide
- La chromatographie analytique sur couche mince CCM bidirectionnelle.
- La chromatographie sur micro colonne.

Les structures des produits isolés de fraction de colonne ont été déterminées par la combinaison de méthode spectrale à savoir la spectrométrie UV visible.

Mots clés: *Cymbopogon schoenanthus*, plante médicinale, métabolite secondaire.

# Abstract

*Cymbopogon schoenanthus*, known under the common name "Lamade" is a medicinal plant widely used in the south of Algeria, in traditional medicine. It belongs to the family of Poaceae. The crude methanol extract was obtained by maceration extraction (ME), using methanol as a solvent / water 70/30% (v / v).

The rates of obtained fractions (petroleum ether, ethyl acetate, dichloromethane, n butanol) are: 1.04%, 1.06%, 1.045% and 1.61%.

The compounds of the isolated fractions were separated by different techniques:

- Analytical thin-layer chromatography ATC on silica gel.
- Analytical thin-layer chromatography ATC on polyamide gel
- Bidirectional Analytical thin-layer chromatography
- Micro column chromatography.

The structures of the isolated column fraction products were determined by the spectral method combination namely visible UV spectrometry.

**Key words:** *Cymbopogon schoenanthus*, medicinal plant, secondary metabolite.

# الملخص

*Cymbopogon schoenanthus*، تعرف بالاسم الشائع " اللماد"، هي نبتة طبية تستخدم على نطاق واسع في جنوب الجزائر ، في العلاج التقليدي. تنتمي إلى عائلة Poaceae .

في هذه الدراسة، تم الحصول على مستخلص الميثانول الخام عن طريق الاستخلاص بالتقطيع ، باستخدام الميثانول كمذيب / ماء 30/70٪ (v / v).

مردود الجزيئات التي تم الحصول عليها (أثير البترول ، اثيل اسيتات، ديكلوروميثان، ن بيتانول) هي: 1.04٪ ، 1.06٪ ، 1.045٪ و 1.61٪.

مكونات الجزيئات المعزولة تم فصلها بتقنيات مختلفة:

- التحليل الكروماتوغرافي ذو طبقة رقيقة على هلام السيليكا.

-التحليل الكروماتوغرافي ذو طبقة رقيقة على هلام بولي أميد

-التحليل الكروماتوغرافي ثنائي الاتجاه على طبقة رقيقة

-الكروماتوغرافيا على عمود دقيق.

بنية المنتجات المعزولة لجزيئات الأعمدة تم تحديدها بواسطة طريقة الربط الطيفي المتمثلة في الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية.

**الكلمات المفتاحية:** *Cymbopogon schoenanthus* ، النباتات الطبية ، الأيض الثانوي.

# **Introduction Générale**

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX<sup>ème</sup> siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type[1].

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse [2].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits [3].

Les plus représentés sont les flavonoïdes et les tannins. Elles ont été utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la médecine, la nutrition, l'assaisonnement, les boissons, les teintures et les cosmétiques [4].

Notre travail constitue une contribution à la séparation et la purification de quelques principes actifs de plante: *Cymbopogon schoenanthus*, issue de la région Ghardaïa. Pour ce contexte, le travail s'échelonne sur deux grandes parties réparties en quatre chapitres. La première partie regroupe quelques généralités sur les plantes médicinales et la plante étudiée.

En deuxième partie, nous présentons d'abord les matériels et les méthodes utilisés dans ce travail. Nous avons ensuite entamé une évaluation des résultats.

# **Chapitre I**

## **Les plantes médicinales et les principes actifs**

## **I. Les plantes médicinales :**

### **I.1. Définition :**

La plante est un organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales [5].

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques [6].

En d'autres termes nous pouvons dire que les plantes médicinales regroupent l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Il peut s'agir de la tige, des feuilles, de l'écorce ou encore des racines qui sont employées à des fins curatives [7].

Dans le Code de la Santé Publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique. C'est une plante, non mentionnée en tant que médicament, qui est vendu librement par les pharmaciens [8].

On peut distinguer deux types des plantes médicinales : En premier lieu se trouve l'allopathie dans laquelle les plantes ont une action importante et immédiate, beaucoup plantes utilisées dans ce mode de traitement peuvent s'avérer toxiques. En effet deux tiers des médicaments sur le marché sont d'origine naturelle, principalement végétale. Puis on différencie les plantes dépourvues d'effet iatrogène mais ayant une activité faible. Elles sont utilisées en totalité ou bien une des ses parties seulement [9].

### **I.2. L'origine des plantes médicinales :**

Elle porte deux origines des plants. En premier lieu les plantes spontanées dites "sauvages" ou "de cueillette", puis en second les plantes cultivées [10].

#### **I.2.1. Les plantes spontanées :**

La valeur médicinale des plantes spontanées se montre très inégale sur le territoire puisqu'elle varie en fonction de l'origine, du terrain et des conditions de croissance. Ainsi, le

Genêt-à-balai (*Cytisus scoparius* L.) de Bretagne est délaissé pour l'extraction de la spartéine au profit de celui du Morvan car la richesse en alcaloïdes y est favorisée par la rigueur du climat [11].

### **I.2.2. La plante cultivée :**

La culture des plantes évite ces inconvénients. Elle assure une matière première en quantité suffisante, homogène au double point de vue aspect et composition chimique. Elle peut être intensifiée ou non suivant les besoins médicaux. Naturellement, la culture doit s'effectuer dans les meilleures conditions possibles et tenir compte, entre autres, des races chimiques [12].

### **I.3. Utilisation :**

Il faut savoir que les plantes médicinales sont utilisées par l'homme depuis près de 7000 ans et que certains animaux, comme les grands singes, les consomment dans un but thérapeutique [13].

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps comme remèdes contre plusieurs maladies. A titre d'exemple, l'ail, le gingembre, la menthe, le thym, la sauge, le fenugrec, le genévrier, l'origan et l'absinthe sont utilisés comme antiseptiques, anti-inflammatoires, antiparasitaires et pour la stimulation de la digestion et le traitement de plusieurs maladies gastro-intestinales [14]

Grâce à leur richesse en métabolites secondaires, ces plantes sont utilisées comme additif dans l'alimentation des ruminants, dans le but de trouver des alternatives aux antibiotiques ionophoresles « ionophores endogènes qui sont présents dans la cellule » pour l'amélioration des fermentations dans le rumen [15]. Plusieurs études ont montré l'efficacité de ces plantes, tels que le programme de l'Union Européenne «Rumen-up» destiné à la recherche et l'identification des plantes riches en molécules actives à effet bénéfique sur la fermentation ruminal [16].

L'étude de l'effet des plantes comme additif repose sur l'utilisation des parties les plus riches en métabolites secondaires telles que les feuilles, les graines, les racines, les fruits, les fleurs, ou la totalité de la partie aérienne de la plante [17].

Cependant, dans certains cas, l'utilisation des plantes brutes peut masquer l'effet des métabolites secondaires grâce à leur forte teneur en sucres ou à la faible dose utilisée, ce qui rend la purification et l'identification de ces substances indispensables pour révéler l'effet et mieux comprendre son mécanisme d'action [18].

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacologie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui sont surtout utilisés en thérapeutique.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche est orientée vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, ou des matières premières pour la semi synthèse [19].

#### **I.4. Les différentes modes de préparation des plantes:**

En dehors des trois préparations classiques des plantes médicinales par les procédés d'infusion, de macération et de décoction, on utilise encore les plantes sous forme de cataplasme, de poudre ou de fumigation [20].

##### **I.4.1. Cataplasme :**

Les cataplasmes peuvent s'apprêter avec divers organes de la plante (bourgeons, feuilles, fleurs, fruit, graines, écorces). Ils sont utilisées en applications externes pour traiter essentiellement les ecchymoses, les foulures, les brûlures, les ulcérations, certaines plaies, les inflammations, les douleurs nerveuses ou musculaires, certaines formes rhumatismales [21].

Il consiste à appliquer sur la peau des préparations de consistance moelle et pâteuse ou encore des préparations de plantes râpées ou écrasées. On utilise aussi des plantes amollies par infusion ou par décoction, dont on fait une espèce de coussin introduit entre deux linges et qu'on applique sur la partie malade. Les cataplasmes peuvent être émollients, résolutifs, calmants ou rubéfiants [22].

##### **I.4.2. Poudre :**

Les plantes desséchées (entières ou feuilles, graines, racines ou écorces) sont broyées, puis incorporées aux aliments (marmelade, confiture) [23].

##### **I.4.3. Fumigation :**

Les fumigations sont très utiles lors des laryngites pour humidifier les muqueuses. Elles apportent un bien-être immédiat et une résolution plus rapide de la pathologie. On fait bouillir ou brûler des plantes, de façon à bénéficier de propriétés thérapeutiques des vapeurs ou fumées produites. Ces vapeurs des plantes aromatiques ont un grand pouvoir désinfectant [24]. Cependant, le malade, parfois, doit humer directement ces vapeurs bienfaisantes en se plaçant au-dessus du récipient retiré du feu, la tête recouverte d'une serviette: il inspire à fond et fait alors inhalation. Aussi, la fumée qui se dégage lorsqu'on fait brûler lentement les plantes, sur les braises du foyer, sert à purifier l'air des chambres des malades [25].

## I.5. Généralité sur *Cymbopogon schoenanthus*:

### I.5.1. Description botanique :

*Cymbopogon schoenanthus* sont trouvés dans Ghardaïa. Cette graminée pousse en touffes denses de 30 à 40 cm de haut, comprenant plusieurs rejets, à souche aromatique. Tiges nombreuses et courtes. Feuilles étroites, longues, souples d'abord, puis coriaces et s'enroule sur elle-même. Tiges florales nombreuses, dressées et très longues. Epis plus ou moins teinté de violet. Toute la plante, mais surtout sa partie inférieure dégage une odeur puissante et très agréable en se desséchant. Période de végétation épiaison en avril-mai.

Habitat: en pieds isolés sur sols caillouteux, dans les lits d'oued et les ravins [26].

### *Cymbopogon schoenanthus* (Lemmad)

### I.5.2. Position systématique : [27]

- **Règne:** Végétal.
- **Sous Règne:** Tracheobionta.
- **Super Embranchement:** Spermatophyta.
- **Embranchement:** Magnoliophyta.
- **Classe:** Liliopsida.
- **Sous classe:** Commelinidae.
- **Ordre:** Cyperales.
- **Famille:** Poaceae.
- **Genre:** *Cymbopogon*.
- **Espèce:** *Schoenanthus*.



**Figure 1:** *Cymbopogon schoenanthus* (L.) spreng [1]

**I.5.3. Utilisation :**

Elle est très réputée pour ses vertus médicinales. Pharmacopée : ses gaines foliaires et ses souches sont utilisées sèches ; en infusion comme diurétique et pour donner de l'appétit et en décoction pour soigner les troubles intestinaux et les intoxications alimentaires. Intérêt pastoral : plante broutée par les chèvres et les dromadaires [28].

Dans la médecine traditionnelle de la région de Ghardaïa cette espèce a été utilisée pour un diurétique et calment.

**I.6. Les métabolites des plantes médicinales :**

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits " secondaires" dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [29].

**I.6.1 Métabolites primaires :**

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme. Ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal, se retrouvent dans toutes les espèces. Les métabolites primaires rassemblent : les acides aminés, les lipides, les glucides....ect [30].

**I.6.1.1. Les glucides :**

Représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois (cellulose). Les glucides sont constitués par des chaînes plus ou moins longues de particules élémentaires (oses) et on peut les classer en glucides simples et glucides complexes selon le nombre de particules élémentaires qui les constituent autrement dit selon leur degré de polymérisation. Entrent dans la classe des glucides simples, les monosaccharides (glucose, fructose, galactose) et les disaccharides (lactose, saccharose, maltose) [31].

**I.6.1.2. Les lipides :**

Constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires. Les lipides ou corps gras sont réservés dans les fruits et dans les feuilles, plus rarement dans les tiges et encore dans le mésocarpe du fruit (olive, palmier à huile); comme les plantes dites oléagineuses [32].

**I.6.1.3. Les amines acides :**

Représentent une source primaire de construction des protéines. Les glucides sont des constituants universels des organismes vivants. Parfois appelés hydrates de carbone, ce sont, en première approximation, des composés organiques carbonylés (aldéhydriques ou cétoniques) [33].

**I.6.2. Métabolites secondaires :**

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas encore parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général (métabolisme primaire) : ce sont des métabolites secondaires qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même (rôle de résistance) [34].

**I.6.2.1. Les composées phénoliques :**

Les composants phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines et la maturation des fruits [35].

Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxy cinnamique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines ect....

**I.6.2.2. Alcaloïdes :**

Alcaloïdes sont métabolites secondaires de structure complexe et qui répondent aux critères suivants :

-Molécules organiques.

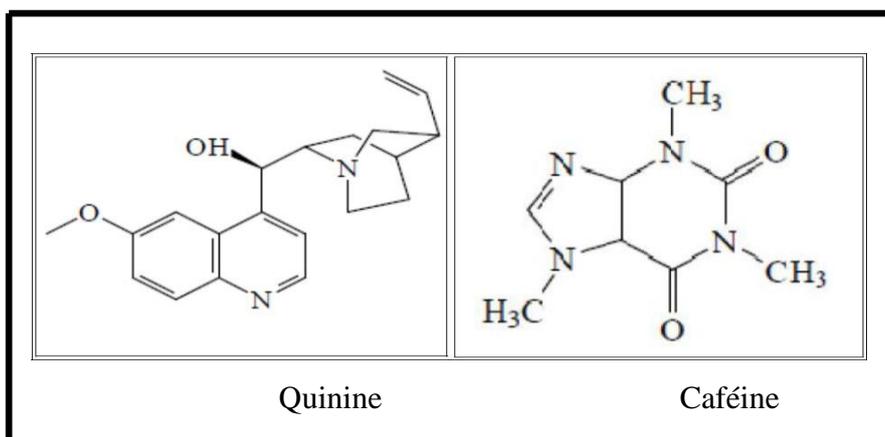
-Molécules azotées = caractère basique

-Insolubles dans l'eau

-Donnent des sels solubles dans l'eau en milieu acide.

Il existe de très nombreux alcaloïdes avec des propriétés pharmacologiques variées souvent très toxiques (marge thérapeutique étroite) [36].

En plus de la choline qui est connue comme constituant des cucurbitacées [37], a révélé la présence de trois autres alcaloïdes : (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> et C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>NO) considérés comme des dérivés de la pyridine, tandis que le troisième (C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>) a été suggéré être le dérivé de la pyridine ou de la quinoléine.



**Figure 02:** Structure de quelques alcaloïdes [2].

### I.6.2.3. Les saponines :

Le mot saponine est dérivé du mot latin *sapo*. Les saponines ont reçu leur nom du fait qu'elles produisent une mousse semblable à celle du savon [38]. Les saponines sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules tri terpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou tri terpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile [39].

Plusieurs études montrent la capacité des saponines à moduler la fermentation ruminal. Des résultats satisfaisants sont obtenus avec plusieurs extraits de plantes riches en saponines [40]. Les saponines sont capables de diminuer le méthane produit lors de la fermentation grâce à l'inhibition des protozoaires ciliés qui sont en symbiose avec les archaebactéries méthanogènes [41]. Elles provoquent la lyse de ces microorganismes par la formation de complexes irréversibles avec le cholestérol présent dans leurs membranes cytoplasmiques [42]. Cependant, le nombre de protozoaires est fortement affecté par la nature du régime alimentaire ce qui limite l'effet des saponines.

#### I.6.2.4. Polyphénols :

Composés aromatiques possédant au moins 1 groupement phénol. Il en existe plusieurs sous-groupes : acides phénols, flavonoïdes, coumarines, tanins. Toute la classe des polyphénols est surtout utilisée dans les phytomédicaments pour traiter les troubles de la circulation veineuse. Les molécules sont souvent sous forme d'hétérosides (ce qui est très rarement le cas pour les alcaloïdes) [43].

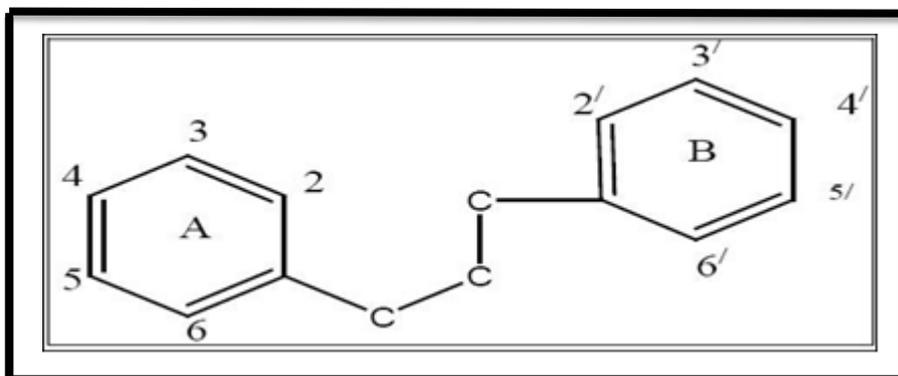
Ces composés jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction, offrant une protection contre prédateurs et agents pathogènes [44], en plus de contribuer vers la couleur et de caractéristiques sensorielles fruits et légumes. Le bénéficiaire effet dérivé de composés phénoliques a été attribué à leur activité antioxydant [45].

Ces composés ont été signalés de posséder non seulement une activité anti-oxydante, mais aussi des propriétés antiviraux et antibactériens [46].

#### I.6.2.5. Les flavonoïdes :

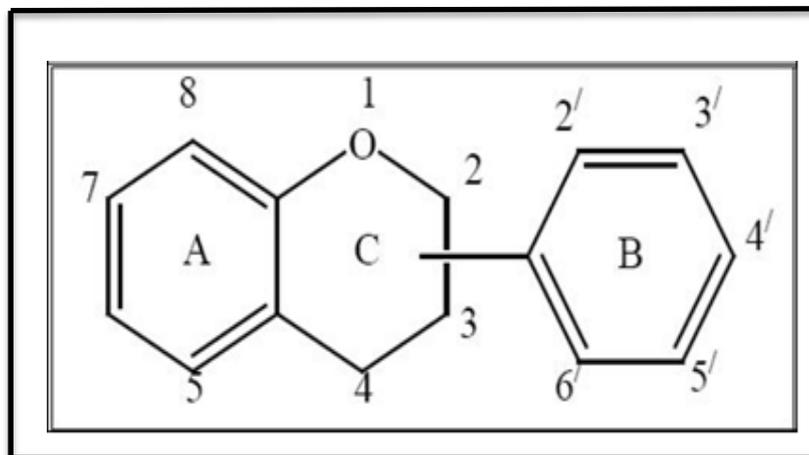
Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes) [47]. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base. Elles se divisent généralement en cinq classes : flavonols, flavones, anthocyanidines, flavonones et chalcones [48].

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C<sub>6</sub> (A et B) reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> [49].



**Figure 03:** squelette de base des flavonoïdes [3].

La chaîne en C3 formant un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A. La structure chimique des flavonoïdes reportée dans la figure 03 contient un squelette C15 constitué par un noyau chromane et un noyau aromatique placé en position 2, 3 ou 4 [50].



**Figure 04 :** structure chimique générale des flavonoïdes [4].

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très répandus dans le règne végétal. L'activité antimicrobienne de ces métabolites secondaires a été testée sur le microbiote ruminal et la totalité des études suggère un effet limité sur la fermentation dans le rumen [51].

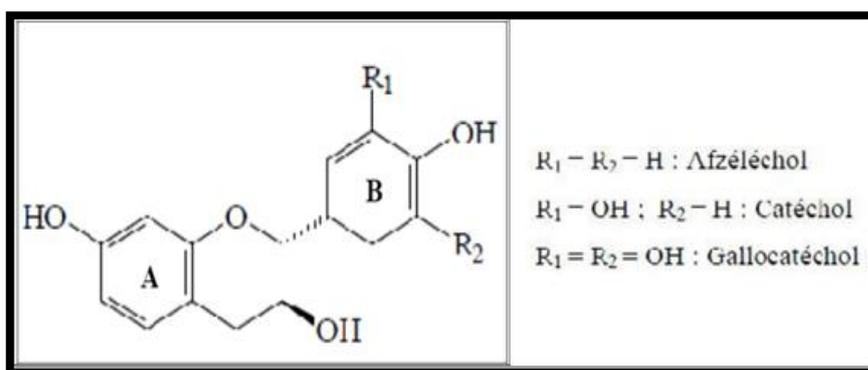
Cependant, quelques travaux rapportent des effets bénéfiques, certains extraits de plantes riches en flavonoïdes peuvent diminuer la production de méthane et stimuler le métabolisme microbien dans le rumen. Dans une étude portée sur l'effet de 13 extraits de plantes riches en flavonoïdes sur la fermentation ruminal en une culture continue, les extraits de

*Lavandula officinalis* et de *Solidago virga-aurea* stimulent la fermentation, alors que les extraits d'*Equisetum arvense* et de *Salvia officinalis* diminuent la méthanogènes [52].

#### **I.6.2.6. Les tanins :**

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Da [53], ils peuvent former des complexes avec les protéines grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques. Ils sont présents dans plusieurs plantes fourragères avec des proportions différentes [54], selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [55].

Les tanins sont des inhibiteurs pour plusieurs microorganismes du rumen et spécialement, les protozoaires ciliés, la flore fibrolytique et les archaebactéries méthanogènes [56]. Les tanins à faible poids moléculaire ont une activité inhibitrice plus importante car ils sont capables de former des liaisons plus fortes avec les enzymes et les protéines en général, comparativement aux tanins à un poids moléculaires élevé. L'inclusion des différents types de fourrages riches en tanins montre une réduction de la production de méthane in vitro et in vivo, cependant, la digestibilité est susceptible d'être fortement diminuée si la concentration de ces composés dépasse les 5% dans la ration [57].

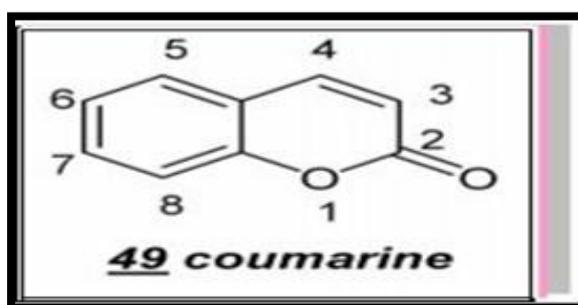


**Figure 05:** Structure de quelques tanins [5].

#### I.6.2.7. Les coumarines :

Les coumarines tirent leur nom de « **coumarou** », nom vernaculaire de la fève Tonka, coumarounaodorata (légumineuses) d'où la coumarine fut isolée, en 1820, elles sont largement distribuées dans le règne végétal.

En dehors de quelques rares cas, dont la coumarine elle-même 49, toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombellifères 50, est le précurseur des coumarines 6,7-di-et 6,7,8-trihydroxylées [58].



**Figure 06:** structure chimique de coumarine [6].

### I.6.2.8. Les huiles essentielles :

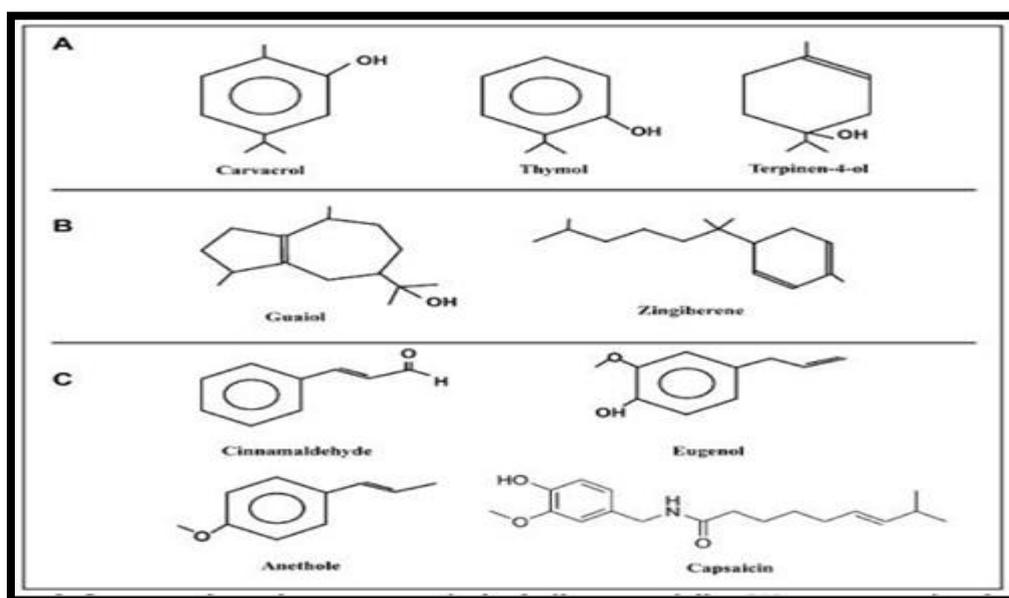
Le terme huiles essentielles (HES) dérive de « quintessentiel », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenus par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante [59]. Huile essentielle = mélange complexe constitué principalement de mono terpènes et parfois de sesquiterpènes.

Les huiles essentielles sont des liquides visqueux de densité inférieure à celle de l'eau [60], non miscible, toujours caractérisée par son odeur, très sensibles à la lumière (oxydation rapide), il n'y a pas une seule molécule c'est un mélange, sensibles à la chaleur [61].

Ces HE sont utilisées en aromathérapie, mais ont aussi des propriétés antibactériennes, et sont utilisées comme conservateurs. Certaines HE sont très toxiques surtout celles contenant des molécules comme la TUYOLE (neurotoxique) [62].

Approximativement 3000 HES sont connues, alors que 300 sont commercialement importantes. Grâce à leurs activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et à leurs fragrances, les HES sont utilisées dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique... Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois [63]

Les HES peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, rhizomes, fruits et graines [64].

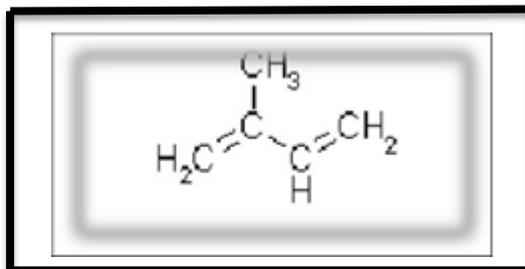


**Figure 07:** Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes [7].

**I.6.2.9. Terpènes :**

Les terpènes forment un groupe de produits largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, bien que de structures très diverses [65].

Les dérivés terpéniques peuvent être considérés en tant que polymères du 5-carbone 2-méthyl-1,3-butadiène ou isoprène [66].



**Figure 08 :** Structure de la molécule d'isoprène [8].

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent on distingue: les Mono terpènes en C10 les Sesquiterpènes en C15 les di terpènes en C20 les tris terpènes en C30 les tétras terpènes en C40 et les poly terpènes (~4000). Les mono terpènes et les Sesquiterpènes volatils sont les principaux composants des huiles essentielles [67].

**I.6.2.10. Stéroïdes :**

Plantes de la famille des discordées. Leurs racines sont très riches en molécules stéroïdiques : diogénine. Les chimistes ont utilisé cette molécule pour fabriquer par hémisynthèse, tous les corticoïdes et contraceptifs oraux. La synthèse totale est presque impossible et très coûteuse [68].

# **Chapitre II**

Technique d'extraction,  
purification et identification

## **II.1. Généralité sur l'extraction :**

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques. L'extraction de molécules organiques est une phase primordiale dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique.

En effet, si les hommes se soignent depuis des millénaires à l'aide de plantes, c'est tout simplement car elles contiennent des molécules présentant une activité thérapeutique spécifique.

Or les plantes sont d'un emploi souvent délicat et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes pouvant, dans certains cas, entraîner la mort. Il convient donc d'isoler les composés actifs seuls [69].

## **II.2. Procèdes d'extraction :**

Il est recommandé d'utiliser des échantillons secs, gelés, ou lyophilisés. En effet, les composés phénoliques dont les flavonoïdes font partie, sont instables et peuvent être dégradés par l'action d'enzymes s'ils ne subissent pas un séchage préalable [70].

Les fours à séchage diminuent l'extraction de quelques types de flavonoïdes tels que les Catéchines lesquelles resteraient liés aux fibres et protéines, en plus, une dégradation thermique peut avoir lieu. Par contre, l'élimination d'eau par lyophilisation n'affecte pas excessivement les composés, et permet leur entretien pour de longues périodes. La congélation préalable des échantillons est aussi recommandée puisque les cristaux gelés produisent des lésions dans la structure cellulaire du matériel végétal et par conséquent facilite le sort des composés et donc facilite le processus d'extraction [71].

Des méthodes dites conventionnelles, comme la macération, le Soxhlet et l'extraction par Percolation ou par reflux, étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels.

### **II.2.1. La macération :**

Cette technique est un procédé discontinu qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant, pour en extraire les constituants solubles. Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité. De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé (24 h) et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du

Solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée [72].

Après filtration, le résidu peut être remis dans le récipient d'extraction avec une nouvelle portion de solvant. Au besoin, le processus est répété plusieurs fois. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, surtout avec les solvants à ébullition, mais le processus d'extraction n'est pas toujours très efficace [73].

### II.2.2. L'extraction par l'appareil de Soxhlet :

Cette technique permet le traitement de solides (matériel végétal) en plus grande quantité, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé.

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté [74] .

Le principe d'extraction est basé sur celui de l'extracteur de Soxhlet. Cependant, il possède de nombreux avantages du point de vue de la durée d'extraction, de la quantité de solvant utilisé et du nombre d'échantillons à traiter au cours d'une seule manipulation. En effet, le Soxtec permet à l'utilisateur de réaliser des extractions en lots allant jusqu'à six échantillons au cours d'une seule manipulation dont la durée est d'environ une heure.

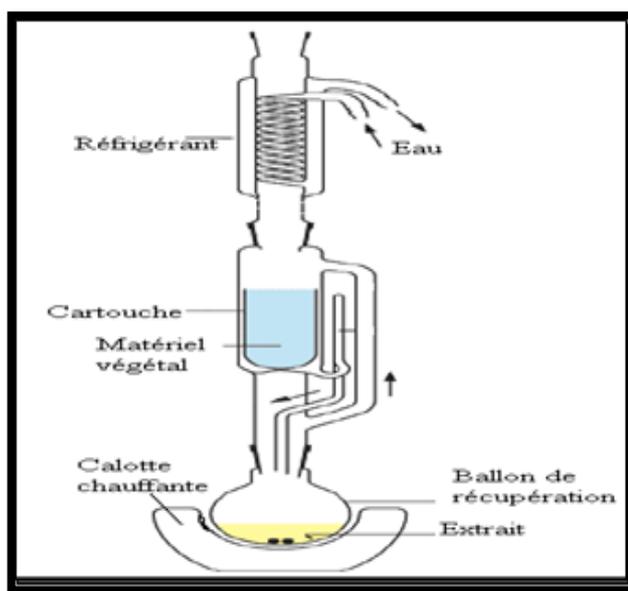


Figure 09 : System soxhlet [9].

### **II.2.3. L'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) :**

La SWE est une utilisée l'eau chaud à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau), et c'est sous l'effet de fortes pressions que l'eau est maintenue sous sa forme liquide [75]. L'eau à température ambiante est un solvant polaire qui possède une permittivité ( $\epsilon' = 75.5$ ). Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue et sa constante diélectrique devient équivalente à celle du méthanol ( $\epsilon' = 33$ ) ou de l'éthanol ( $\epsilon' = 24$ ) [76]. Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires et non polaires sans utiliser de solvants organiques.

### **II.2.4. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritique Fluide Extraction) :**

L'extraction par les fluides supercritiques s'est considérablement développée ces dernières années et a fait l'objet de très nombreuses publications scientifiques. Reverchon et De Marco [77]. ont publié une revue sur l'utilisation de cette technique pour l'extraction et le fractionnement des matières naturelles végétales.

Les fluides supercritiques ont des propriétés différentes de celles d'un gaz ou d'un liquide, comprises entre les deux. Ils ont ainsi une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au fluide liquide, ce qui facilite leur pénétration dans des milieux poreux [78].

La SFE est principalement utilisée avec le CO<sub>2</sub> supercritique. Le terme supercritique signifie que le CO<sub>2</sub>, sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO<sub>2</sub> supercritique. Sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la Pression est considérablement réduite [79].

En plus du coût de l'appareillage, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par CO<sub>2</sub> Supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules. Apolaires et qui nécessite l'ajout de Co-solvants comme le méthanol ou l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires [80].

Les conditions d'obtention du CO<sub>2</sub> supercritique sont assez faciles à atteindre (303°K, 73,8 bar).

Alors que pour l'eau puisqu'il faut atteindre une température de 374,2°C et surtout une Pression de 218 bar. Pour ces raisons, l'utilisation du CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique s'est

Imposée. La température opératoire permet ainsi d'extraire des constituants sans les dénaturer et en conservant les qualités biologiques et/ou organoleptiques. De plus, l'extrait sera exempt de tout solvant à pression et température ambiante. De plus le CO<sub>2</sub> est non toxique, incolore, inodore et inflammable, ce qui permet des conditions de Sécurité supérieures [81].

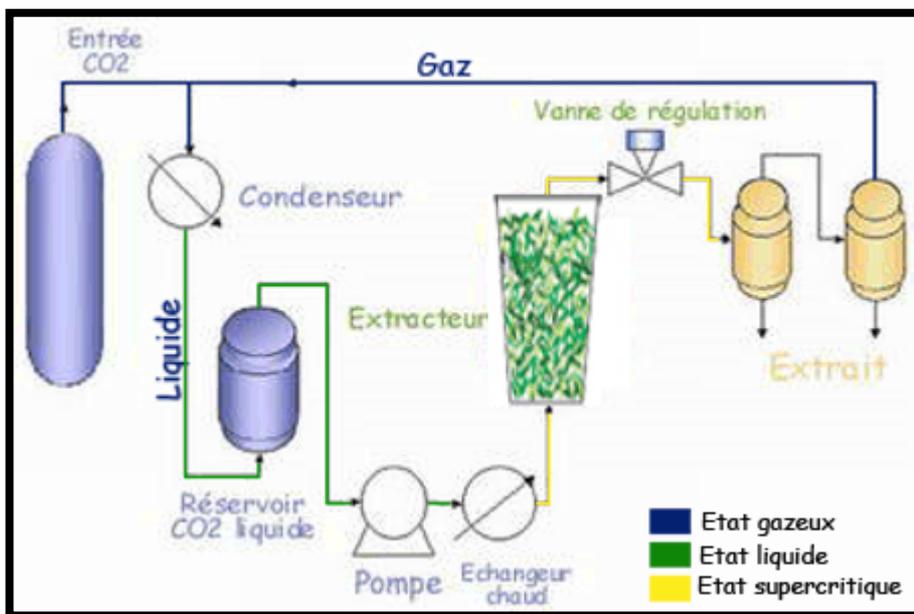


Figure 10 : Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique. [10]

### II.2.5. Extraction par micro-ondes :

En 1986, Ganzler [82] furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle. En 1990, Paré [83] ont proposé d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal [84]. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [85]. L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [86].

### II.2.6. Extraction liquide- liquide :

Extractions liquide-liquide effectuées dans des ampoules à décantier. L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. Elle consiste à faire passer un produit

dissous dans une phase liquide, appelé le soluté, dans une seconde phase liquide non miscible avec la première. En pratique, les solutés sont souvent dans une phase aqueuse. Un solvant organique est utilisé pour les extraire. Le choix du solvant d'extraction devient dès lors impératif [87].

Les solvants *apolaires*: possédant un moment dipolaire permanent nul. Par exemple, le benzène. Les hydrocarbures: alcanes ramifiés ou linéaires, alcanes cycliques, alcènes, etc.

Les solvants *portiques*: possédant un ou plusieurs atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'eau, le méthanol, l'éthanol, etc. [88]. Les solvants *polaires aprotiques*: possédant un moment dipolaire non nul et dénué d'atomes d'hydrogènes susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN), le diméthylsulfoxyde (DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), le tétrahydrofurane (THF, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O), etc.

Il faut noter aussi qu'en présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes [89].

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires 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.

### **II.3. La purification :**

En chimie, la purification est la séparation de substances chimiques dans le but de décontaminer des substances [90].

Il existe plusieurs moyens de purification:

- La cristallisation.
- La chromatographie.

#### **II.3.1. La chromatographie:**

La chromatographie est une méthode physique de séparation et purification basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte, soit de leur absorption et de leur désorption

successive sur la phase stationnaire, soit de leur Solubilité différente dans chaque phase dans le cas où les deux phases sont des liquides [91].

Il existe plusieurs méthodes de séparation chromatographique en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode. On peut envisager une chromatographie sur colonne (C.C), sur couche mince (C.C.M) ou sur papier (C.P).

Enfin, on peut considérer également la chromatographie liquide à haute pression (C. L. H. P) et la (C. P. G), qui se présentent comme étant des techniques instrumentales basées sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique [92].

### **II.3.1.1. 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 systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [93]. L'élution 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'élution peut être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

### **II.3.1.2. Chromatographie sur papier CP :**

On peut utiliser du papier ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes. Les marques principales sont Wattman, Scheider et Shull, Durieux et Arches. Il existe huit catégories de papier Wattman, classées selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse. Par exemple le papier Wattman n°1 est le plus utilisé, mais ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant des taches très denses et uniformes. La description de l'analyse par chromatographie sur papier est identique à celle sur couche mince [94].

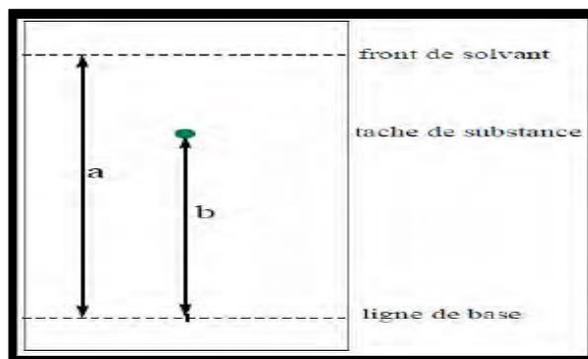
### **II.3.1.3. La chromatographie sur couche mince CCM :**

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. 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 dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) 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 [101].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'ondes  $\lambda = 254 \text{ nm}$  et  $365 \text{ nm}$ ).

Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal (Rf).



**Figure 11** : Plaque chromatographique éluee permettant le calcul du **Rf** [11]

### II.3.2. La cristallisation:

C'est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides.

Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de cristallisation.

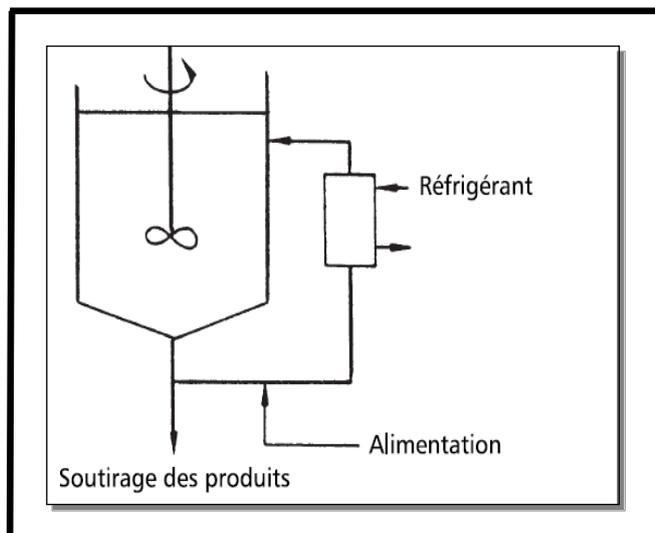
On appelle meilleur solvant de cristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid. Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid [95] .

La complexité des procédés de cristallisation rend difficile une classification des équipements utilisés. Le fonctionnement des cristalliseurs peut être discontinu, semi-continu ou continu (adopté si l'on cherche à obtenir de gros cristaux, uniformes, de pureté maximale) [96] .

Excepté le mode de fonctionnement, on parle aussi de :

- cristalliseurs par refroidissement,
- cristalliseurs par évaporation,

- cristalliseurs fonctionnant sous vide,
- cristalliseurs fonctionnant en milieu fondu.



**Figure 12:** Cristalliseurs à refroidissement par contact direct [12]

## II.4. Méthode de l'identification :

### II.4.1. Spectrométrie de masse (MS) :

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge, la séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader [97]. L'échantillon est placé sur une lame, le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre [98].

### II.4.2. Spectrométrie d'infrarouge :

La spectrométrie infrarouge est une méthode utilisée pour identifier les différents groupes de métabolites secondaires des plantes. La méthode est basée sur l'excitation des molécules par des radiations infrarouge. L'absorption des rayonnements de nombres d'ondes comprises entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$  entant qu'énergie de vibration moléculaire modifie à la fois

les états de rotation et de vibration des molécules [99]. La spectrométrie d'IR est basée sur l'absorption ou la réflexion par l'échantillon des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 50  $\mu\text{m}$ . Dans le proche et moyen IR, l'absorption de la lumière par la matière a pour origine l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les liaisons chimiques. Les atomes situés aux deux extrémités d'une liaison sont animés d'un mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre et s'ils sont différents ils forment un dipôle électrique oscillant à cette même fréquence. Si on irradie à cette même fréquence, il y aura absorption [100].

#### **II.4.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN) :**

La RMN tire des informations de l'interaction qui naît entre les noyaux des atomes de certains éléments présents dans l'échantillon et le champ magnétique intense et constant, produit par un aimant auquel on le soumet (signaux de résonance). Sur un appareil, on donne la fréquence nominal du proton qui est lié au champ de l'appareil (entraîne  $1\text{H}=400\text{MHz}$ ) Le spectre RMN correspond à l'absorption, par certain atome de l'échantillon, de certaines des fréquences présentent dans la source électromagnétique. Cette technique fait appelle au spin des noyaux qui permet d'expliquer le comportement des atomes dans un milieu où il règne une direction privilégiée. Il ne faut donc pas de spin nul pour étudier un atome en RMN il ne faut donc pas que  $A$  (nucléon) et  $Z$  (proton) soient toutes deux paires, sinon il n'y a pas de spin (donc pas de RMN) [101].

# **Chapitre III**

## **Matériel et méthodes**

### III.1. La récolte :

La récolte de la plante *Cymbopogon schoenanthus* a eu lieu au mois février 2018 à 11 :30 dans la région sabsabe - (Ghardaïa), à 56 km du sud de la wilaya de Ghardaïa.

Les paramètres géographiques de notre station d'étude sont représentés dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude

Station	Partie étudiée	Longitude	Latitude	Etage bioclimatique
Sabsabe	Partie aérienne	5°35	32°9	Aride

### III.2. Conservation des échantillons :

Après la récolte, le matériel végétal (partie aérienne) est nettoyé, étalé et séché à l'abri de la lumière et de l'humidité et à la température ambiante. Après le séchage, le matériel végétal est conservé dans des sacs en papier.

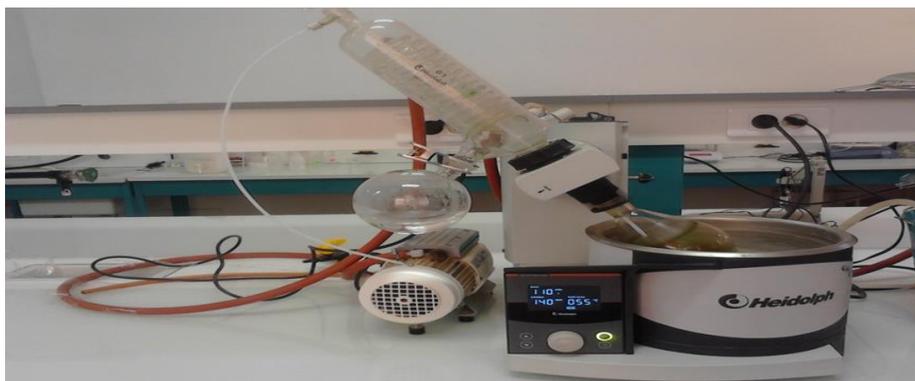
### III.3. Extraction et fractionnement des principes actifs :

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, L'opération bien que généralement longue et a rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles.

#### III.3.1. Mode d'opération :

La macération consiste à émerger 226 g de *Cymbopogon schoenanthus* sèche avec un mélange méthanol/eau (70/30) (v/v) pendant 48 heure à la température ambiante, l'extrait obtenu a été filtré et concentré à l'aide d'un rotavapor type hepldophe.

Nous procédons ensuite à une extraction liquide/liquide successivement par l'éther de pétrole, en suite dichlorométhane, acétate éthyle, finalement par n-butanol. Les extraits organiques sont évaporés dans un rotavapor, à une température de [30-50 ] °C, les extraits obtenus a été conservé au 4°C jusqu'à l'utilisation.



**Figure13:** Evaporateur rotatif [origine].

### III.3.2. Calcul de rendement :

Le rendement des extraits a été calculé par la formule suivante:

$$R\% = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \times 100$$

Où :

**R:** est le rendement en %.

**M<sub>ext</sub>:** est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

**M<sub>éch</sub>:** est la masse sèche la plante en g.

### III.3.3. Le fractionnement de l'extrait brut :

L'extrait brut obtenu a été placé dans une ampoule à décanté. Ensuite, il a été soumis à un processus de séparation liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante éther de pétrole, dichlorométhane et acétate d'éthyle et n-butanol. Selon la méthode décrite par [109]. Cette étape est caractérisée par la spécificité et la polarité du solvant organique.

#### III.3.3.1. Extraction par l'éther de pétrole :

Cette phase a été réalisée avec l'éther de pétrole qui permet à extraire les aglycones (Composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes). Dans ce cas, le mode opératoire de cette phase est comme suit :

- Ajouter **200 ml** de la phase aqueuse (v/v) aux **1/3 ml** d'éther de pétrole.

- Bien agiter et laisser reposer le mélange au moins **20** minute jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique ou éther de pétrole (coté supérieur) et une phase aqueuse (coté inferieur).

- Répéter la procédure trois fois.
- Évaporer la phase organique obtenue ( $T^{\circ} = [30-50] \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- Séchage de l'extrait par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
- Recueillir l'extrait par **6 ml** d'éther de pétrole (récupéré).

#### **III.3.3.2. Extraction par le dichlorométhane :**

Cette manipulation a été effectuée selon le même protocole précédent. La phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir de la phase éther de pétrole et la phase organique a été évaporé également au rotavapor ( $T^{\circ} = 40^{\circ}\text{C}$ ).

Enfin, Séchage de l'extrait par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , l'extrait sec de chaque phase a été conservé dans 6 ml le dichlorométhane (récupère).

#### **III.3.3.3. Extraction par l'acétate d'éthyle :**

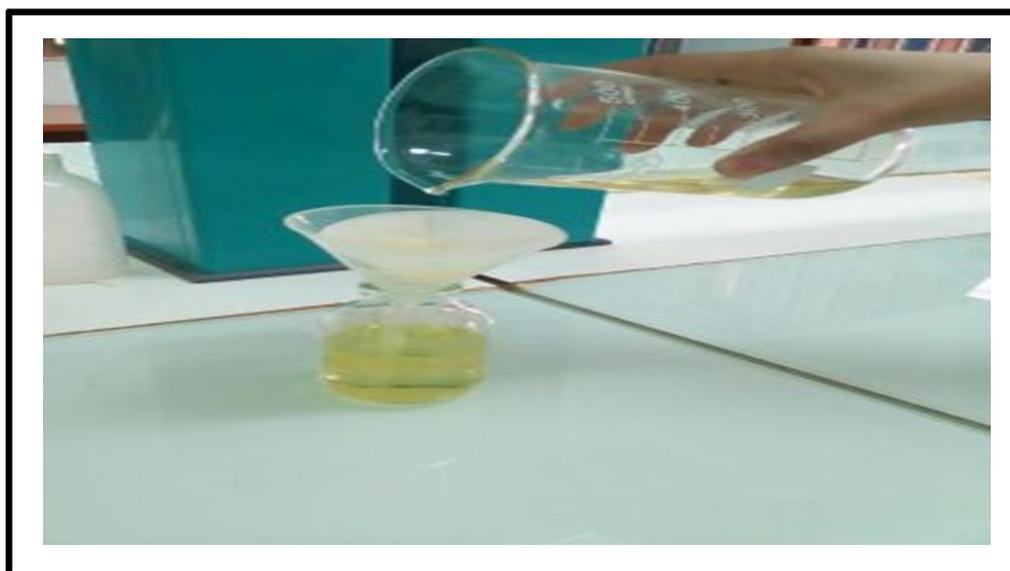
Cette phase a été réalisée par dichlorométhane. Elle a été effectuée selon le même protocole Précédent.

Dans ce cas la phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir la phase l'éther de pétrole et la phase organique obtenue a été évaporé au rotavapor ( $T^{\circ} = 50^{\circ}\text{C}$ )

Nous rappelons que cette phase permet d'extraire les mono glycosides et partiellement les di glycosides. Enfin, Séchage de l'extrait par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , l'extrait sec de chaque phase a été conservé dans 6 ml l'acétate d'éthyle (récupère).



**Figure 14** : Extraction liquide- liquide (origine).



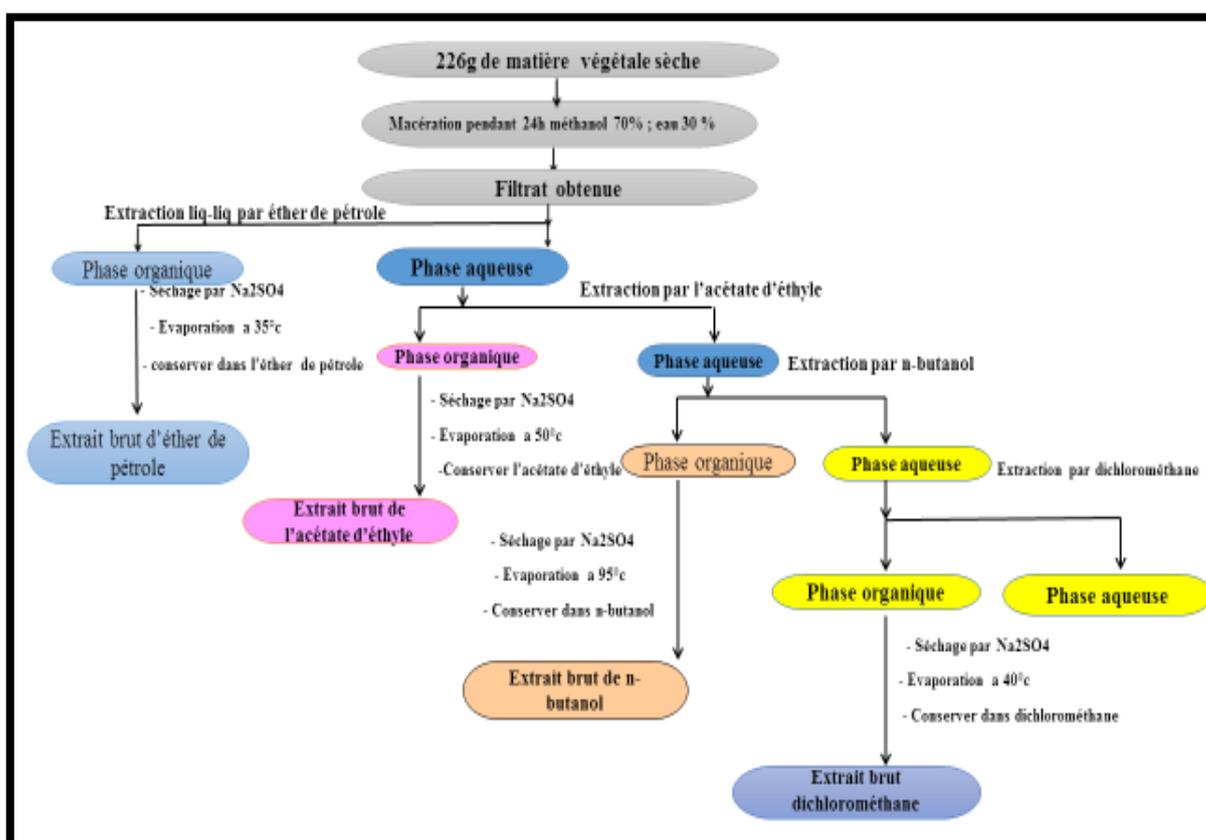
**Figure 15** : Séchage de l'extrait par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (origine).

#### **III.3.3.4. Extraction par le n-butanol :**

Cette manipulation a été effectuée selon le même protocole précédent. La phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir de la phase acétate d'éthyle et la phase organique a été évaporé également au rotavapor ( $T^\circ=95^\circ\text{C}$ ).

Cette phase permet d'extraire le reste de di-glycoside et le tri-glycoside. Enfin, Séchage de l'extrait par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , l'extrait sec de chaque phase a été conservé dans 6 ml n-butanol (récupère).

**Remarque :** en vaporé extré de n-butanol à  $T^\circ=95^\circ\text{C}$  mes non éliminé le solvant Alor utilise température real de vaporisation ( $T^\circ=110^\circ\text{C}$ ) puisque la température real est un ( $T^\circ=118^\circ\text{C}$ )



**Figure 16:** Schéma mode d'extraction solide et fractionnement.

### III.4. Analyse chromatographique des extraits par CCM :

Dans notre étude et pour la détermination de la composition des d'extraits fractionnement de l'éther de pétrole, dichlorométhane, acétate éthyle, n-butanol, en utilisant la chromatographie analytique sur couche mince CCM.

#### III.4.1.Principe :

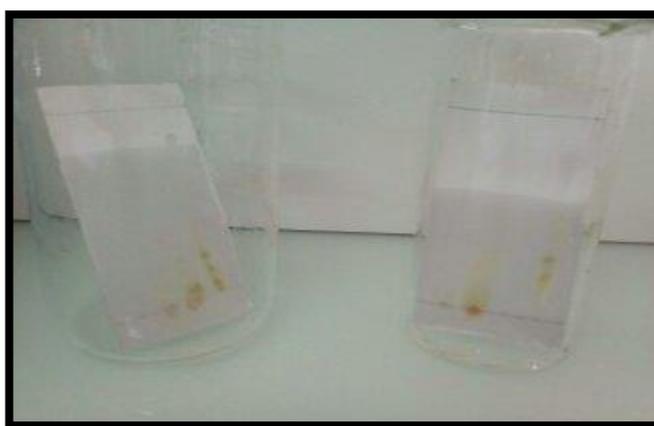
La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long

d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

- Cuve à chromatographie: Un récipient en verre fermé par un couvercle étanche.
- Phase mobile (éluant ou système solvant)

**Tableau 2:** Différents pourcentages de éluant (hexane / acétate d'éthyle) utilisés pour la CCM gel de silice pour tester tous les extraits.

<b>Eluant</b>	<b>Parentage (%)</b>
<b>Hexane /acétate d'éthyle</b>	<b>100 %</b>
<b>Hexane /acétate d'éthyle</b>	<b>90 /10</b>
<b>Hexane /acétate d'éthyle</b>	<b>70 /30</b>
<b>Hexane /acétate d'éthyle</b>	<b>60 /40</b>
<b>Hexane /acétate d'éthyle</b>	<b>50 /50</b>



**Figure 17 :** Teste de CCM pour des extraits éluant hexane /acétate d'éthyle (origine).

**Tableau 3 :** différent éluant testé pour CCM gel de silice.

<b>Eluant</b>	<b>Composition d'éluant</b>
<b>CH<sub>3</sub>-MEOH</b>	<b>96-4</b>
<b>n-butanol-acétate éthyle -eau</b>	<b>65-15-25</b>
<b>Dichlorométhane-acide acétique-eau</b>	<b>2-1-1</b>
<b>CH<sub>3</sub>-MEOH-acétate éthyle</b>	<b>90-5-5</b>
<b>acétate éthyle-hexane</b>	<b>1-1</b>
<b>CH<sub>3</sub> -MEOH</b>	<b>92-8</b>

### III.4.2. Protocole de CCM sur gel de polyamide :

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de polyamide SC6.

- Phases mobiles: Toluène-MeOH.
- Extraits : tout extré fractionnement.
- La visualisation des plaques est effectuée sous la lampe UV.

**Tableau 4:** D'éluant testé pour CCM poly amide.

<b>Eluant</b>	<b>Contité d'éluant</b>
Toluène-MeOH	100%
Toluène-MeOH	90-10
Toluène-MeOH	80-20
Toluène-MeOH	60-40

**Phase stationnaire :** Le plus utilisé est le gel de silice, c'est une couche d'environ 0,25 mm fixée sur une plaque d'aluminium.

**Echantillons :** Les extraits des différentes phases obtenues, la phase dichlorométhane, la phase éther pétrole, la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol, phase brut.

**Révélateurs :** lampe UV 254 nm.



**Figure18** : lampe UV VL-4.L (origine).

### III.4.3. Mode opératoire :

La chromatographie sur couche mince (CCM) effectuées sur les extraits : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, n-butanol ,dans les systèmes d'élution déférente pourcentage A chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système de solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque .

Enfin calculer le rapport frontal (**Rf**) pour chaque spot par la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le constituant}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

### III.4.4. L'analyse des résultats obtenus par la CCM :

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité:

- Les poly hydroxy flavones ont des faibles valeurs de **Rf (0,00-0,25)**.
- Les oligohydroxy et les oligométhoxy flavones ont des valeurs de **Rf** comprises entre **(0,3-0,5)**.
- Les flavonones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de **Rf (0,5-0,75)**.

**Tableau 5:** Nature des composés à séparer par CCM [1].

Type de chromatographie	Nature des composés à séparer
Gel de silice	Molécules organiques simples, molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substances à haut poids moléculaire.
Polyamide	Composés hydrophiles de séries homologues. Phénols et dérivés nitrés aromatiques

#### III.4.5. La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnel :

La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle effectuées sur l'extrait : acétate d'éthyle, dans les systèmes d'élution déférentes pourcentage (**élution 1 : CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub>/MeOH**) (**élution 2 : CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub>/MeOH/Acétate d'éthyle**) (**élution 1 : 96/4**) (**élution 2 : 90:5:5**) plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système de solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque .les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque.

#### III.4.6. Chromatographie sur micro colonne :

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- ❖ La phase stationnaire: support solide.
- ❖ La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- ✓ L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la

colonne est très lent.

- ✓ La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Pour la phase mobile et stationnaire :

- Phase stationnaire : gel de silice +hexane.
- Phase mobile : hexane- acétate d'éthyle (**70-30**).

**Remarque :** extré fractionnement utilisé pour cette étude CC extré d'acétate d'éthyle.

### **III.4.7. Techniques d'identification structurale :**

#### **La spectrophotométrie UV-visible :**

La spectrophotométrie UV-Vis est une des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la structure chimique, les propriétés physico-structurales, et les caractéristiques optiques de divers types de composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque chromophore absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les fonctions chimiques dans les molécules à différentes conditions opératoires en se basant sur des témoins et des bases de données de la littérature.

#### **Principe:**

La spectrophotométrie est une méthode quantitative et aussi qualitative, sensible, elle permet d'analyser les échantillons à faible concentration. Les spectres sont caractéristiques aux Molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions. Le spectre UV/vis. Des composés flavoniques solubilisés dans le méthanol présente deux bandes ; qui se situent respectivement entre **320 nm – 380 nm** correspondant au cycle B et **240 nm – 270 nm** correspondant au cycle A. Ce spectre est susceptible d'être modifié en présence des réactifs spécifiques, dont les changements du spectre apportent des indications sur la position des substitutions (groupements hydroxyles) sur la molécule.

# **Chapitre IV**

## **Résulta et discussions**

#### IV. 1. Rendement d'Extré brut et fractionnement :

Les parties aériennes de la plante *Cymbopogon schoenanthus* ont été soumises à une macération dans un mélange hydro-alcoolique froid ; après évaporation de l'alcool, une extraction liquide- liquide est faite pour la phase aqueuse avec des solvants : éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol puis après l'évaporation des solvants, les extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur avant d'être analysés. L'histogramme ci-dessous représente les couleurs et les rendements de chaque extrait obtenu :

**Tableau 4** : Couleurs et rendements des extraits obtenus.

Les extraits	Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Brut	<b>Marron tré foncé</b>	<b>18,6</b>
éther de pétrole	<b>Marron foncé</b>	<b>1,04</b>
l'acétate d'éthyle	<b>Marron moins foncé</b>	<b>1.06</b>
dichlorométhane	<b>Marron claire</b>	<b>1,045</b>
n-butanol	<b>Marron plu claire</b>	<b>1.61</b>

#### IV.2. Résultats obtenues par la chromatographie sur couche mince :

Cette technique nous a donné une indication sur le contenu en polyphénols et en Particulier en flavonoïdes des extraits analysés, et procure les informations nécessaires Pour la poursuite des autres analyses préparative. Les spots sont visualisés sous les longueurs d'onde 254 nm puis 365 nm, cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes que la première longueur d'onde. Comme il existe une relation entre la fluorescence et la nature ainsi que les substitutions du composé flavoniques chromatographie, nous résumons les résultats dans le tableau.

**Tableau 5**: Relation entre structure et couleur de flavonoïdes.

Couleur de tache	Type de flavonoïde
<b>Brun</b>	3-OH absent ou 3-substitué
<b>move</b>	Flavone 5-OH et 4-OH Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH Flavone 6 ou 8 OH Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanones
<b>Bleu clair</b>	Flavone sans 5-OH libre Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué

<b>Jaune</b>	5-OH libre ou 5-OH substitué
<b>Jaune fluorescent</b>	avec 3-OH libre Aurone, chalcone, flavanone
<b>Jaune pâle</b>	Dihydroflavonol

Aussi la valeur du Rf (facteur de rétention) permet d'avoir une idée sur le flavonoïde Ainsi que la nature de ses substituants. En effet, on peut différencier les aglycones des Hétérosides. Il faut cependant signaler que les valeurs de Rf dépendent des conditions Expérimentales telles que : la température, la nature du solvant, la concentration de L'échantillon et la nature de la matière. Le tableau 6 cette relation Structure – Rf.

**Tableau 6:** Relation entre le Rf et les structures des flavonoïdes.

<b>Structure des flavonoïdes</b>	<b>Rf</b>
Augmentation de nombre des groupements –OH	Diminution de Rf dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements -CH 3	Croissement de Rf dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements osidiques	La valeur de Rf diminue dans les systèmes organiques et croit dans les systèmes aqueux

### IV.3. Etude dès l'extrait par différentes méthodes chromatographiques :

#### Chromatographie sur couche mince CCM:

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur les extraits de la phase acétate D'éthyle, éther de pétrole, dichlorométhane, n-butanol en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice. La meilleure Séparation a été obtenue avec les déférents systèmes confirmant également leur richesse En composés phénoliques en montrant des spots des couleurs Par la suite les chromatogrammes. Les résultats du changement de couleur après visualisation par la lampe UV sont résumés sur les tableaux.



**Figure 18 :** teste de CCM pour des extrés éluant hexane /acétate d'éthyle (original)

**Tableaux 7 :** Rf et couleur des taches sur lampe UV des extré testé par CCM gel de silice

Phase mobiles	Extré éther de pétrole			Extré acétate d'éthyle		Extré dichlorométhane		Extré n-butanol	
	Rf	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur
HEXANE 100%	0.1	+	Jaune vert brillant	+	move	-	-	-	-
	0.4	+	move	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	+	Vert	-	-	-	-
	0.8	-	-	+	Jaune	-	-	-	-
Hexane / Acétate d'éthyle 90/10	0.1	+	Orange	-	-	+	Jaune	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	+	move	-	-	-	-	-	-
Hexane/ Acétate d'éthyle 70/30	0.2	+	Jaune	+	vert	-	-	-	-
	0.4	+	orange	-	-	+	jaune	-	-
	0.7	+	move	+	move	+	orange	-	-
	0.9	+	vert	-	-	+	move	-	-
Hexane/Ac étate d'éthyle 60/40	0.1	-	-	-	-	+	jaune	-	-
	0.4	+	jaune	-	-	+	orange	-	-
	0.5	+	orange	-	-	-	-	-	-
	0.6	-	-	-	-	+	move	-	-
	0.8	+	move	-	-	+	vert	-	-
Hexane/Ac étate d'éthyle 50/50	0.1	-	-	+	Jaune	+	Jaune	-	-
	0.3	-	-	+	jaune	+	jaune	-	-
	0.4	+	orange	+	move	+	move	+	jaune
	0.5	-	-	+	vert	+	vert	+	move
	0.6	+	vert	-	-	-	-	-	-

+ : Présence il y a cette valeur.

- : Présence né pas cette valeur

**Résultat :** après les tableaux (7) optinut percentage l'éluant bien séparé les fractions est un Hexane /Acétate d'éthyle (50/50). Après les couleurs de cette resulta on a Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.

**Tableaux 8 :** Rf et colleur des taches sur lampe UV des extré testé par CCM gel de silice

Phases mobiles			FR Ether de pétrole		FR Acétate d'éthyle		FR dichlorométhane		FR n- butanol		FR brut
Phases mobiles	Rf	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur
(CHCl <sub>3</sub> )/(MeOH) 96/4	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	+	vert	+	vert	-	-
	0.6	-	-	+	Jaune	-	-	-	-	+	orange
	0.7	+	orange	+	orange	-	-	-	-	-	-
	0.8	-	-	-	-	+	Vert	-	-	+	Move
	0.9	+	jaune	+	orange	-	-	-	-	-	-
CHCl <sub>3</sub> /acétate d'éthyle /H <sub>2</sub> O 90-5-5	0.1	-	-	-	-	+	jaune	-	-	-	-
	0.7	-	-	-	-	-	-	+	move	+	move
	0.9	+	orange	+	vert	-	-	-	-	-	-
Acétate d'éthyle /hexane 1-1	0.3	-	-	+	Jaune	+	Jaune orangée	-	-	-	-
	0.4	-	-	+	orange	-	-	-	-	-	-
	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Move
	0.7	-	-	+	Move	-	-	-	-	-	-
	0.9	+	vert	-	-	-	-	-	-	-	-
CH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> /MEOH 92 - 8	0.1	-	-	+	Jaune	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	+	Orange	-	-	-	-	-	-
	0.6	-	-	+	Move	-	-	-	-	+	Move
	0.9	+	orange	+	Vert	-	-	-	-	-	-
Acide acétique /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O 2 -1 -1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Présence il y a cette valeur.

- : Présence né pas cette valeur

**Résultat :** après les tableaux (8) optinut percentage l'éluant bien séparé les fractions en CCM gel de silice est un CH<sub>3</sub>/MeOH (96 /4). Après les couleurs de cette resulta on a Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre et Dihydroflavonol.

**Tableaux 9 :** Rf et colleur des taches sur lampe UV des extré testé par CCM de poly amide.

Phase mobile Toluène/MEOH %				FR Acétate d'éthyle		FR Dichlorométhane		FR n- butanol		FR brut
100%	Rf	Rf	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur	Rf	couleur
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	+	jaune
	0.4	+	-	-	+	orange	-	-	-	-
	0.8	-	-	-	+	vert	-	-	-	-
90-10	0.2	-	+	Jaune	+	Orange	-	-	-	-
	0.3	-	+	orange	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	+	move	-	-	-	-	-	-
	0.7	-	-	-	-	-	-	-	+	Jaune
	0.9	+	+	Vert	-	-	-	-	-	-
80-20	0.2	-	+	jaune	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	+	Orange	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	+	move	+	move	-	-	+	move
	0.9	+	+	vert	-	-	-	-	-	-
60-40	0.2	-	+	Move	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	+	vert	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	+	vert
	0.6	-	-	-	-	-	+	move	-	-
	0.7	-	-	-	+	move	-	-	-	-
50-50	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	jaune	-	-	-	-	-	-
	0.4	+	jau ne	orange	-	-	+	Jaune orangée	-	-
	0.7	-	-	-	+	orange	-	-	+	move

+ : Présence il y a cette valeur.

- : Présence né pas cette valeur

**Résultat** : d'après les tableaux (9) optinut pourcentage l'éluant bien séparé les fractions en CCM poly amide (Toluène/MEOH) (80 /20). Après les couleurs de cette résulta on a Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.

**Tableau 10** : affinité des extrés avec défèrent éluant sur CCM gel de silice.

	Eluant 1	Eluant2	Eluant3	Eluant4	Eluant5	Eluant6	Eluant7
FR-éther de pétrole	-	-	+	-	+	-	-
FR-acétate d'éthyle	+	+	+	-	+	-	+
FR-dichlorométhane	+	-	+	-	+	+	+
FR-n butanol	+	-	+	-	-	+	+
FR-brut	-	-	+	-	-	-	-

+ : Présence il donné résulta.

- : Présence né pas donné résulta.

Eluant 1 : Hexane/Acétate d'éthyle (50/50)

Eluant2 : CH-Cl<sub>3</sub> /Me-OH (96-4)

Eluant3 : n-butanol/acétate d'éthyle/H<sub>2</sub>O (65-15-25)

Eluant4 : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acide acétique /H<sub>2</sub>O (2-1-1)

Eluant5 : CH-Cl<sub>3</sub> /Me-OH / acétate d'éthyle (90-5-5)

Eluant6 : Acétate d'éthyle/ Hexane (1-1)

Eluant7 : CH-Cl<sub>3</sub> /Me-OH (92-8)

**Résultat** : d'après les tableaux (10) optinut pourcentage l'éluant bien séparé tous les fractions en CCM gel de silice est un : **n-butanol/acétate d'éthyle/H<sub>2</sub>O (65-15-25)**.

#### **La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle effectuées sur le extrait : acétate d'éthyle, dans les systèmes d'éluion déférentes pourcentage (**élution 1 : CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> / MeOH**) (**élution 2 : CH-Cl<sub>3</sub>/MeOH/Acétate d'éthyle**) (**élution 1 : 96/4**) (**élution 2 : 90 :5 :5**) plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les

vapeurs du système de solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque .les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque.

**Tableau 11** : colleur La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle

Dépôt	Couleur
Extré d'acétate d'éthyle	Move
	Vert
	Orange
	Bleu

**Résultat** : après tableaux (11) on vue le résultat de La chromatographie sur couche mince (CCM) bidirectionnelle est un même résulta de CCM poly amide.

#### **Chromatographie sur micro colonne :**

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases.

- Phase stationnaire : gel de silice +hexane.
- Phase mobile : hexane- acétate d'éthyle (50-50).

**Tableau 12:** nombre de fraction et sa couleur.

N° de la fraction	Couleur de fraction
1	claire
2	claire
3	claire
4	claire

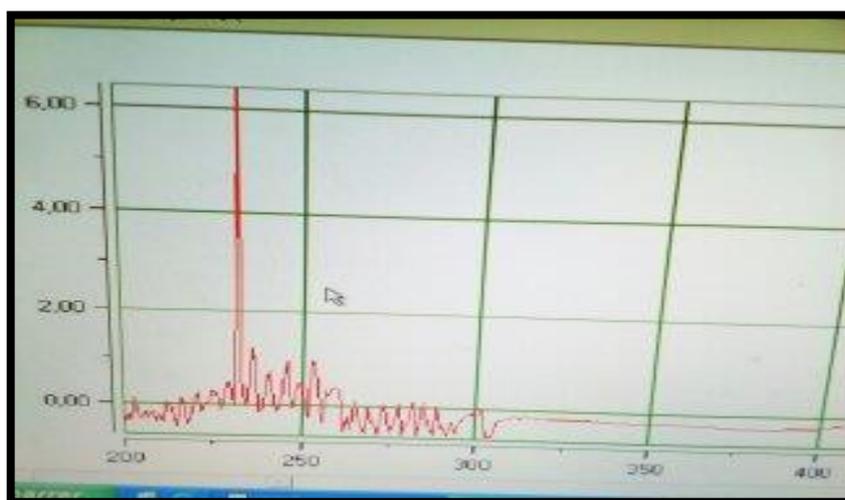
#### IV.4. La spectrophotométrie UV-visible :

La spectrophotométrie est une méthode donné quelque des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions. Le spectre UV/vis. Des composés flavoniques solubilisés dans le méthanol présente deux bandes ; qui se situent respectivement entre **320 nm – 380 nm** correspondant au cycle B et **240 nm – 270 nm** correspondant au **cycle A**. Ce spectre est susceptible d'être modifié en présence des réactifs spécifiques, dont les changements du spectre apportent des indications sur la position des substitutions (groupements hydroxyles) sur la molécule. Présentant un maximum d'absorption entre **240-280nm**, elle est attribuée l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau **A** est nous informe sur les variations structurales du cycle **A**.

**Tableau 13** : fraction avec sa logue max d'onde.

N° de la fraction	Longue d'onde max en spectro scan 40
1	242 nm
2	232 nm
3	218 nm
4	246 nm

**Résultat** : après le tableau (13) et La spectrophotométrie UV-visible De composé flavoniques présente bandes **240 nm – 270 nm** correspondant au **cycle A**.



**Figure 19** : La spectrophotométrie UV-visible 40 pour fraction 2

# Conclusion Générale

## Conclusion

---

Ce travail une contribution à la purification et la caractérisation chimique de quelques principes actifs de l'extrait hydro-alcoolique de *Cymbopogon schoenanthus* de la région de Ghardaïa.

L'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*, concentre et fractionne par une séries des extractions liquide- liquide, solvants utilisés sont les : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, et n-butanol successivement. Les fraction obtenues a été analysées par la CCM (gel de silice et poly amide), dans ce travail nous avons essayé d'optimiser les éluants et phases stationnaires pour faire séparer le maximum des substances extraites.

Les produits isolés par la CCM et par la colonne classique ont été révélées par la combinaison la spectrophotométrie UV Visible. Les résultats de CCM par de plaques de gel de silice nous ont montrés que l'éluant (n-butanol/acétate d'éthyle/H<sub>2</sub>O (65-15-25).) c'est le plus adapté pour la séparation de maximum des produits sur la colonne chromatographique classique. En revanche, les résultats des plaques CCM poly amide nous ont donné des bonnes résultats avec l'éluant Toluène/MEOH (80 /20).

La séparation bidirectionnelle sur plaque CCM de gel de silice nous a montré que on peut obtenir de produits séparés que les plaques polyamide

La chromatographie sur micro colonne de gel de silice nous a permet de séparer quelque fraction de l'acétate d'éthyle, quatre fraction obtenues ont été caractérisé par la spectrophotométrie UV Visible.

- De composé flavoniques présente bandes **240 nm – 270 nm** correspondant au cycle A.

# Référence

# Bibliographique

- [1]. GHABRIER J. Y., **2010**. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165.
- [2]. SANAGO R., **2006**. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 49-50
- [3]. Gwinner J., Harnisch R. ET Mück O., (**2004**). Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte, Projet de production des stocks et des récoltes, GTZ, p 388
- [4]. ABI FARAJ C., **2005**. A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga (Spain): 193
- [5]. SANAGO R., **2006**. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.
- [6]. GOEB Ph. (**1999**), Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB.
- [7]. COWAN M.M., **2010**- Plant Product as antimicrobien agents. Clinical Microbiologie Reviews. 12 : 564–582.
- [8]. GUIGNARD J.L., **2000**- Biochimie végétale.2ème Ed. Dunod Paris: 169.
- [9]. El Bakouri H., (**2006**). Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. Thèse de doctorat en Sciences, Université Abdelmalek Essaadis, Faculté des Sciences et Techniques de Tanger.
- [10]. Chaabi, M. (**2008**). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de Magister ; spécialité phytochimie ; Université Mentouri de Constantine et Université Louis Pasteur.
- [11]. Akroum S. (**2011**) Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri Constantine p : 35.
- [12]. BARDEAU F. (**1976**), La médecine par les fleurs. Laffont éd. P 98.
- [13]. GHABRIER J. Y., **2010**. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165

- [14]. GRAVEL E., POUPON E., HOCQUEMILLER R., **2006**. Biomimetic investigations from reactive lysine-derived C5 units: one step synthesis of complex polycyclic alkaloids from the *Nitraria* genus. *Tetrahedron letters* p: 62.
- [15]. CHAABI M., 2008. Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus* *carpus* Guill. Etperr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat en pharmaco chimie, Université, Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine (Alger) p: 179, 180
- [16]. BOUBAKER J., SKANDRANI I., BOUHLEL I., BEN SGHAIER M., NEFFATI A., GHEDIRA K., CHEKIR-GHEDIRA L., **2010**. Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from *Nitraria retusa*. *Food and Chemical Toxicology* p: 48.
- [17]. BRUNETON J., **2009**. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>ème</sup> édition de médicales internationales (Tec et Doc), Paris.
- [18]. ABI FARAJ C., **2005**. A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga (Spain): 193
- [19]. ABERT VIAN M., FERNANDEZ X., VISINONI F., AND CHEMAT F., **2008**- Microwave Hydro diffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography Food Engineering*, 90(3), 409-413
- [20]. ALAIN DIT PHILIPPE BIDIE BANGA B. N'GUESSAN ADOU F. YAPO, JEAN DAVID N'GUESSAN & ALLICO JOSEPH D., **2011**. Activités antioxydants de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Science et nature*. 8 (1), 1 – 11.
- [21]. ANDRIAMIALIHARISOA R.F., **2011**- Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *mascarocoffea* Et des endophytes des feuilles de *Coffea* sp A315, mémoire magister, Université D'Antananarivo
- [22]. ATHAMENA S., **2008**- Activité antioxydant ET anti micro Bienne d'extraits de *cuminum cyminum* l, *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81
- [23]. AMEENAH G. F., **2006**. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular Aspects of Medicine*, 27:1-93.
- [24]. BABAR ALI M., HAHN E.J., PAEK K.Y., **2007**- Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolic in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 12: 607-621.

- [25]. Gwinner J., Harnisch R. et Mück O., (2006). Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte, Projet de production des stocks et des récoltes, GTZ, p 388
- [26]. BENOUDAH Z., 2009- Etude de l'effet de la toxicité du *Datura stramonium* L. sur le rein du rat blanc (Albinos Wistars) mémoire de magistère, université Mentouri Constantine
- [27]. CHEMAT F., 2011- Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris
- [28]. BALASUNDRAM N., SUNDRAM K., ET SAMMAN S., 2006- Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, Vol. 99: 191–203
- [29]. BEKKOUCHE A., 2007- Etude Ethnobotanique et Chimique d'une Plante Médicinale *Xanthium strumarium*. Mémoire de magister. Université Badji Mokhtar –Annaba. p 73
- [30]. El Bakouri H., (2006). Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. Thèse de doctorat en Sciences, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences et Techniques de Tanger.
- [31]. BOUAL Z., 2009- Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla. p80.
- [32]. BOUDJELAL A., 2012- Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga reptans*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences en Biochimie Appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba. p95.
- [33]. Chaabi, M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de Magister ; spécialité phytochimie ; Université Mentouri de Constantine et Université Louis Pasteur

- [34]. Akroum S. (2011) Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. *Thèse de doctorat en sciences*. Université Mentouri Constantine
- [35]. BOUDJOUREF M., 2011- Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne. D'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire magister .Université Ferhat Abbas, Sétif. p64.
- [36]. AYAD R., 2008. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Zygophyllum cornutum*, Mémoire de Magistère, Université Mentouri de Constantine (Alger): 124.
- [37]. BOUHADJERA K., 2005- Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse De Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. p 143.
- [38]. BOUSSAHEL S., 2011- Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas. Sétif. p 74.
- [39]. Athamena S. (2009) Etude quantitative des flavonoïdes des grains de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. *Thèse de magister*. Université Batna
- [40]. Hofmann L. 2003 .Thèse de doctorat: Etude du métabolisme des phényles propanoïdes, Strasbourg, France,
- [41]. BROUDISCOU L.P., LASSALAS B., 2000- Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganismes in batch culture. *Reproduction Nutrition développements*. 40 : 431–440.
- [42]. BUCHANAN, 2008- Métabolites secondaires. Cap. 24. p32.
- [43]. BURT S., 2004- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiologie*
- [44]. Gerhard, 2012 L. Métabolisme des végétaux; physiologie et biochimie, 5ème Edition, Allemand,
- [45]. CALSAMIGLIA S., BUSQUET M., CARDOZO P.W., CASTILLEJOS L., FERRET A., 2007- Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90: 2580–2595.
- [46]. CHABERIER J.Y. 2010- plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de docteur d'Etat en pharmacie. Université H.P. Nancy1 France. p 173

- [48]. CHEBROUK F., **2009**- Caractérisations analytiques de quelques composés poly phénoliques et terpéniques issus de la plante Marrubium désert de la région de Ghardaïa. Memoir de magister. Universite Kasdi Merbah Ouargla. p76
- [49]. Redoyal, **2005** L.M., Beltran, M., Sancho, R. ET Olmedo, D.A. Bioorganic and Medicinal chemistry Letters, 15, 4447-4450.
- [50]. CHEHMA A., **2005**- Etude floristique et nutritive des parcours Camelins du Sahara septentrional algérien Cas des régions de Ouargla et Ghardaïa. These Doctorate. Universite Badji Mokhtar. Annaba. p176.
- [51]. CHEHMA A., **2006**- Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Dar L'Ouda Ain M'Lila. p140
- [52]. DEVANT M., ANGLADA A., BACH A., **2007**- Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. Animal Feed Science and Technology. 137: 46-57
- [53]. Middleton.JR. E, Chithan.K. ; **2003**. The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. The Flavonoids: advances in research since 1986. London, UK: Chapman and Hall
- [54]. Bruneton.J. **1999**, *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, 120p.
- [55]. DJABOU N., **2006**- sambuques nigra l ., une plante de la pharmacopée traditionnelle nord-africaine. Thèse de magister en chimie. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen .p14-15
- [56]. DULGER B. ET GONUZ A. **2004**- Antimicrobial activity of some Turkish medicinal plants. Pakistan journal of biological sciences. 7 (9): 1559-1562
- [57]. DZIRI S. et al ., **2012**- Phénolique constituant, antioxydant and antimicrobien activities of Rosy garlic (allium roseum var. odoratissimum). Laboratoire des substances naturelles, Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique, Sidi Thabet, 2020 Ariana, Tunisia. Journal of functional foods 4. V 4 2 3 -4 3 2.
- [58]. GARCIA-GONZALEZ R., LOPEZ S., FERNANDEZ M., GONZALEZ J.S., **2008**- Dose-response effects of Rheum officinalis root and Frangula alnus bark on

ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 319–334

[59]. Stafford.H.A, **2008** role of Flavonoids in symbiol and defuse functions in legume roots, *Bot.rev* 63 27-39

[60]. GOEL G., MAKKAR H.P.S., BECKER K., **2008**- Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* and Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 72–89

[61]. L. Hoffmann; **2003** thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg,

[62]. Bruneton.J (**2005**) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier Technique & Documentation. Paris

[63]. GUIGNARD J.L., **2000**- *Biochimie végétale*. 2ème Ed. Dunod. Paris: 177-185.

[64]. HART K.J., YANEZ-RUIZ D.R., DUVAL S.M., MCEWAN N.R., NEWBOLD C.J., **2008**- Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 8–35.

[65]. Merken H.M., and Beecher G.R. (**2000**) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3), 577-599.

[66]. HELLAL Z., **2011**. Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Pp1-8-45-78. Hydroxylated derivatives of the flavylum cation, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*

[67]. HAVSTEEN B. H., **2002**- The biochemistry and medical significance of the Flavonoids. *Pharmacology Therap*. 96: 67-202

[68]. HEMMAMI H et GUEZEI N., **2013**- Évaluation de l'activité antioxydant d'extraits de *Capsicum annum* L de la région d'el-oued. *Memoir de magister*. Université D'EL-Oued. p 105

[69]. Markham K.R. (**2008**) Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In *The Flavonoids: Advances in research since 1980*. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 427-468.

- [70]. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., and Capasso F. (2000) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65(4), 337-353
- [71]. HOPKINGS W.G., 2003- *Physiologie végétale*. 2ème Ed. Ed De Boeck. Espagne:139-276
- [72]. J. Loisseur, (2013), *Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique*, Tome 1, Editeurs Masson et CIE
- [73]. LA GINIKA L., 2005 -*Étude photochimique et activité biologique de substances naturelle isolée de Béninoise* thèse de doctorat en science pharmaceutique. Université Louis Pasteur Strasbourg, 267p
- [74]. Loisseur, J, 2009 *Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique*, Tome 1, Editeurs MASSON et CIE. .
- [75]. LHUILLIER A., 2007-*Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : Agauria salicifolia Hook.f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae)*. Thèse de doctorat, Université Toulouse, 1-200
- [76]. MAINGONNAT J.F. M., AND CHEMAT F., 2009- Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7700-7707
- [77]. NAIT ACHOUR K., 2012- *Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces eucalyptus poussent dans la région de Tizi Ouzou*. Mémoire de magistère. Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou
- [78]. Markham, K.R. (2002). *Technique of flavonoids identification*, Academic press, London.
- [79]. PENCHEV P.I., 2010- *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions*, thèse de doctorat université Toulouse
- [80]. PETRIER, C., GONDREXON, N. AND BOLDO, P., 2008- *Ultrasons et sono chimie*. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310, 1-14
- [81]. SANDRINE L., 2004- *Lyon ; Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de Légumineuses*. Thèse de doctorat
- [82]. MARKHAM, K.R. (2005), *Method in plant biochemistry*, 1, 197-235, Academic Press. London

- [83]. Athamena(2009)."Etude quantitative des flavonoïdes des grainent de cuminum cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation", Mémoire magister, Université Batna, 26
- [84]. Bensouici Chawki. Thèse de Magister. Universite Mentouri-Constantine.
- [85]. HAINQUE B. BRUNO B. ET PHILIPPE L., 2008- appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire
- [86]. Bourguet E., Auge C. Les techniques de laboratoire: Purification et analyse des composés organiques. Chap. 2: L'extraction; Chap. 5: La chromatographie. Ellipses Edition Marketing S.A., 2008: 19-27; 77-96.
- [87]. Merken H.M., and Beecher G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(3), 577-599.
- [88]. WILSON, R.G., BOWIE, J.H et WILLIAMS, D.H. (1986).Tetrahedron, 24, 1407.
- [89]. Redoyal, L.M., Beltran 2005, M., Sancho, R.et Olmedo, D.A. Bioorganic and Medicinal chemistry Letters, 15, 4447-4450.
- [90]. Hofmann L. Thèse de doctorat: étude du métabolisme desphénylpropanoïdes, Strasbourg, France, 2003
- [91]. JURD L. and HOROWRIT, R. (2002), Spectral properties of flavonoid compounds, in the chemistry of flavonoid compounds, edited by T.A. GEISSMAN, Pergamon Press, New York, 107-155.
- [92]. Athamena S. (2009) Etude quantitative des flavonoïdes des grains de Cuminum cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation de l'activité biologique. Thèse de magister. Université Batna.
- [93]. MARKHAM, K.R. (2005), Method in plant biochemistry, 1, 197-235, Academic Press. London
- [94]. AYAD R., 2008. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce Zygophyllum cornutum, Mémoire de Magistère, Université Mentouri de Constantine (Alger): 124.
- [95]. Akroum S. (2011) Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri Constantine
- [96]. AMEENAH G. F., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow Molecular Aspects of Medicine, 27:1-93

- [97]. Markham, K.R. **1982**. Technique of flavonoids identification, Academic press, London.
- [98]. ABI FARAJ C., **2005**. A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga (Spain): 193
- [99]. Merken H.M., and Beecher G.R. (**2000**) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3), 577-599.
- [100]. Bergel, A. et Bertrand, J. **2004** (sous la direction), Méthodes de génie des procédés. Etudes de CAS. Lavoisier, Hermes Sciences, Paris,
- [101]. Nielsen, J. G. and Moller J. (**1970**). *Acta Chem. Scand.*p: 24, 26, 65.

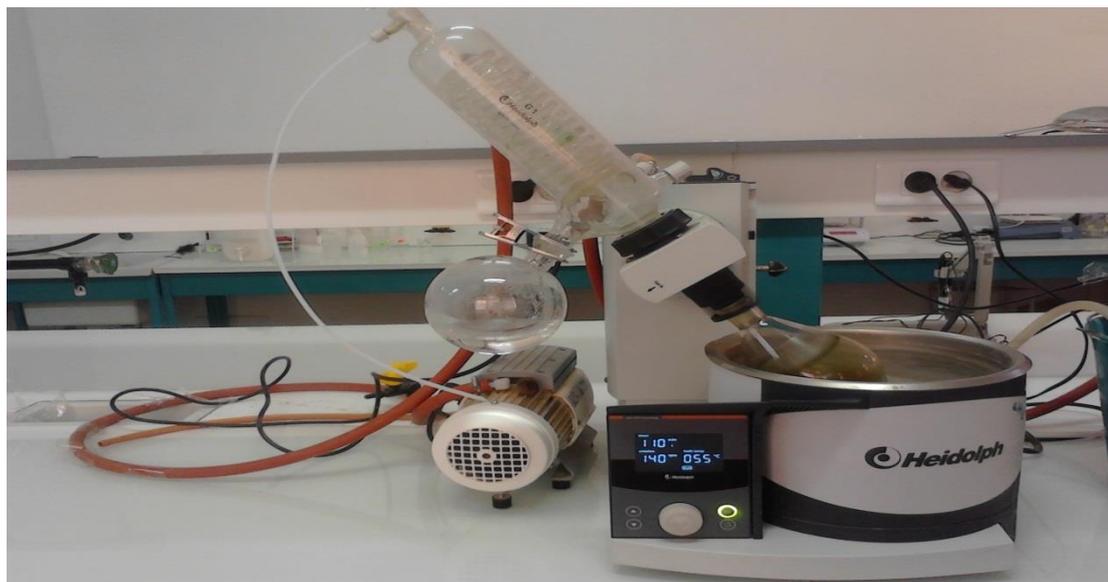
# Annexe



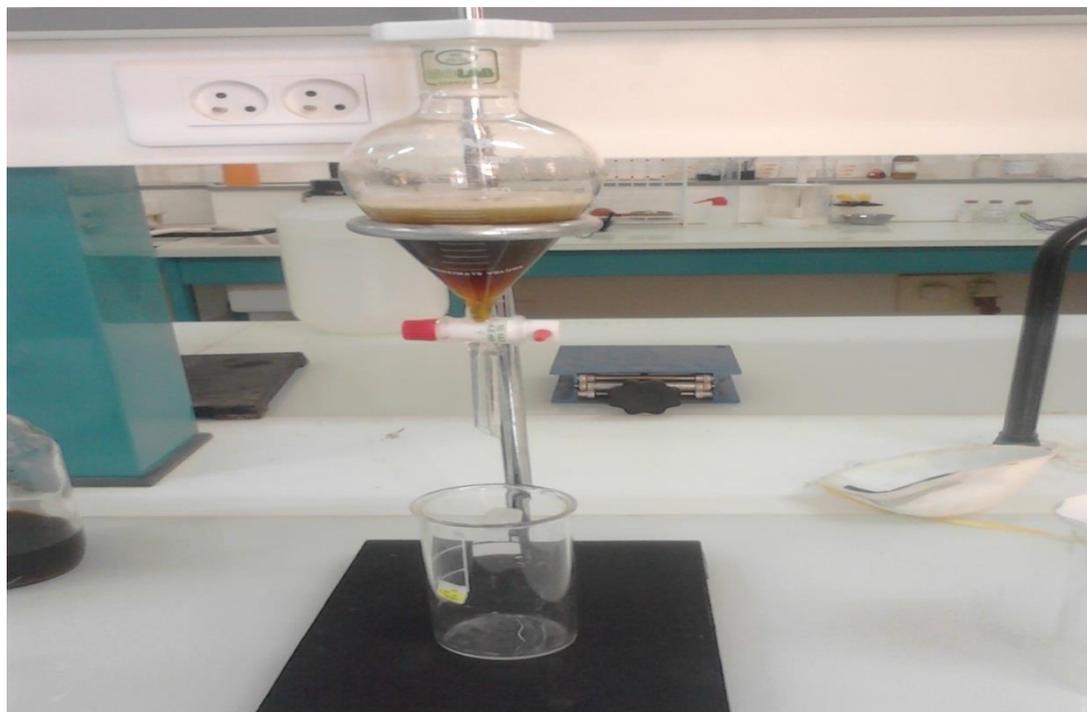
Annexe 01 : Photo de UV Spectrophotomètre : Spéctro-scan 40.



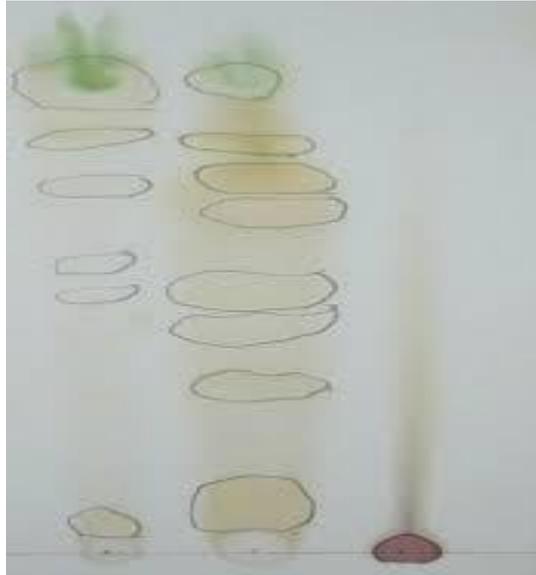
Annexe 02 : Photo de cuve de développement chromatographe



Annexe 03 : Photo d'Evaporateur Rotatif ; Haiplodoph



Annexe 04 : Photo d'extraction liquide-liquide



Annexe 05 : Photo séparation des extré par ccm gel de silice