

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :

N° de série :

Faculté des Sciences et Technologie

Département des Sciences et Technologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : *Sciences et Technologie*

Filière : **Génie des procédés**

Spécialité : *Génie chimique*

Par : NORA BenHammouda

HADJIRA Sebga

Thème

Contribution à La Purification et La Caractérisation Chimique de Quelques Principes Actifs De L'extrait Hydro-alcoolique de « *Pituranthos scoparius* » de La Région de Ghardaïa

Soutenu publiquement le : 21/06/2018.

Devant le jury :

Melle TRABELSI Amel	MAA	Univ. Ghardaïa	Président
Mr BABA ARBI Ilias	MAA	Univ. Ghardaïa	Examineur
Mr ADAMO Youcef	MAA	Univ. Ghardaïa	Examineur
Mlle HELLALI Naima	MCB	Univ. Ghardaïa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

REMERCIEMENT

*En préambule à ce mémoire, nous remercions
ALLAH qui nous a donné la patience et le courage du-
rant nos années d'étude.*

*Tout le respect et les mots de remerciement à notre
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 les membres de jury et les pro-
fesseurs et les étudiants du département de
science et technologie de l'université de Ghardaïa.*

À nos collègues de la promotion génie chimique.

*On remercie sincèrement BENHAMMOUDA
HICHAM de nous avoir aidés pendant notre tra-
vail au laboratoire.*

*Enfin, on remercie chaleureusement tous les membres
de nos familles, et tous ceux qui nous ont aidés de
près ou de loin durant la réalisation de ce travail.*

HADJIRA et NOURA

DEDICACE

Je dédie ce travail à mon père, qui n'a jamais rien abandonné, Et à ma mère, qui m'a donné de l'affection et de l'amour et m'a donné la meilleure éducation.

Je leur dis : Toi et toi m'avez donné la vie et l'espoir et l'émergence d'une passion pour la connaissance et la connaissance.

À mes frères Miloud, Abderrahmane et Slimane

*À mes sœurs Aïcha, Rebaïha, Fatima, Sara et mes petite sœur
Basma*

À toute ma famille de SEBGAG.

*A pour mes amis Khadidja, Mabrouka, Nora, Djamaa, Chahla,
Romaïssa, Siham et Nasira.*

Pour mon travail de petite amie Benhammouda Noura.

Pour mes professeurs

À mes collègues

HADJIRA

DEDICACE

Je dédie ce travail à mon père, qui n'a jamais rien abandonné, Et à ma mère, qui m'a donné de l'affection et de l'amour et m'a donné la meilleure éducation.

Je leur dis : Toi et toi m'avez donné la vie et l'espoir et l'émergence d'une passion pour la connaissance et la connaissance.

À mes frères Saïd, Taha et Abdelghani

À mes sœurs Faïza, Fadila, Naïma, Hanane, Fatima et les petits-enfants.

À toute ma famille de BEN HAMMOUDA.

À ma cousine Ilham.

A pour mes amis Niama, Asma.

Pour mon travail de petite amie Sebgag Hadjira.

Pour mes professeurs

À mes collègues

NORA

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la purification de quelques principes actifs de l'extrait hydro-alcoolique. La présente étude a été effectuée sur une plante médicinale du Sahara algérienne : *Pituranthos scoparius*(Guezzah) dans la région de Ghardaïa.

L'extraction a été effectuée par la macération (méthanol/eau) et l'extraction liquide-liquide par des solvants polaires différents.

L'analyse des extraits a été effectuée par CCM (gel de silice, polyamide), et sous l'UV. Les résultats ont montré la présence des flavonoïdes.

Mots clés : *Pituranthos scoparius*, extraction, purification, principe actif.

ملخص

في إطار الدراسات حول تنقية بعض المركبات النشطة للمستخلص المائي-الكحولي. تم اجراء هذه الدراسة على نبتة طبية في الصحراء الجزائرية القزاح في منطقة غرداية. تم اجراء الاستخلاص بالتنقيع (ميثانول/ماء) و الاستخلاص سائل-سائل بواسطة مذيبات قطبية مختلفة. و تم تحليلها بواسطة الكروماتوغرافية الطبقة الرقيقة بأنواع مختلفة مرفق بجهاز مطيافية الكتلة. و قد تبين من النتائج وجود الفلافونيدات. الكلمات المفتاحية: القزاح، الاستخلاص، التنقية، المركب النشط.

Abstract

In the context of studies on the purification of some active ingredients of the hydroalcoholic extract. The present study was carried out on a medicinal plant of the Algerian Sahara: *Pituranthos scoparius* (Guezzah) in the region of Ghardaia.

Extraction was carried out by alcoholic maceration (methanol / water) and liquid-liquid extraction by different polar solvents.

Analysis of the alcoholic extracts by TLC (silica gel, polyamide gel and development vessel), showed under UV. The results showed us the flavonoids.

Key words: *Pituranthos scoparius*, extraction, purification, active principle.

Sommaire

REMERCIEMENT	I
DEDICACE	II
Résumé.....	IV
Sommaire	V
Liste des abréviations.....	VIII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Introduction générale	1
Chapitre I : Généralités sur la plante	2
I.1- Généralités sur la plante :	2
I.1.1-La famille des Apiacées :	2
I.2.3-Utilisation traditionnel :	5
I.3-Les métabolites :.....	5
I.3.1-Les métabolites primaires :	5
I.3.2-Les métabolites secondaires :	6
I.3.2.1- Composées phénoliques :.....	6
I.3.2.2- Flavonoïdes :	6
I.3.2.3- Les alcaloïdes :	8
I.3.2.4- Les terpènes :	9
I.3.2.5- Les coumarines :	10
I.3.2.6- Les saponines :	10
I.3.2.7- Les tannins :	11
I.3.2.7.1-Les tannins hydrolysables :.....	11
I.3.2.7.2-Les tannins condensés :	12
I.3.2.8-Les stéroïdes :.....	13
chapitre ii : les différentes techniques d'extraction et de séparation et	
d'identification des principes actifs	14
II.1-Définition :	14
II.2- Techniques utilisées pour la séparation des principes actifs :	14
II.2.1-Décoction :	14
II.2.2- Infusion :	15
II.2.3-Macération :	15
II.3- Les techniques de séparation et de purification :.....	15
II.3.1-Chromatographie d'adsorption sur colonne :	16
II.3.2- Chromatographie sur papier (CP):.....	16

II.3.3-La chromatographie sur couche mince (CCM) :	16
II.3.4- La recristallisation :	16
II.3.5- La centrifugation :	17
II.3.6- La filtration :	17
II.4-Les techniques d'analyse et d'identification structurale :	17
II.4.1-La résonance magnétique nucléaire (RMN) :	18
II.4.2-Spectrophotométrie UV-visible :	18
II.4.3- Spectrométrie de masse :	19
II.4.4-Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :	19
II.4.5-Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC :	20
Chapitre III : Matériels et Méthodes	21
III.1-Matériel expérimental :	21
III.1.1-La récolte :	21
III.1.2-Séchage et conservation :	21
III.1.3- Macération :	21
III.1.4- Filtration simple et évaporation sous vide :	22
III.1.5-Extraction et fractionnement des principes actifs :	23
III.1.5.1- Extraction par l'éther de pétrole :	23
III.1.5.2- Extraction par l'acétate d'éthyle :	25
III.1.5.3- Extraction par dichlorométhane :	26
III.1.5.4- Extraction par n-butanol :	26
III.1.6-Le rendement de l'extraction :	26
III.2- L'analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince :	28
III.2.1-Protocole de CCM sur gel de silice :	28
III.2.2-Protocole de CCM sur gel de polyamide :	29
III.2.3-Chromatographie bidimensionnelle :	29
Chapitre IV : Résultats et Discussion.....	31
IV.1- Fractionnement et analyse chromatographique par la CCM :	31
IV.1.1-Fractionnement :	31
IV.1.2-Le rendement de l'extraction :	31
IV.2- Chromatographie sur couche mince :	32
IV.2.1-Chromatographie sur gel de silice :	32
IV.2.2-Chromatographie sur gel de polyamide :	34
IV.2.3-Chromatographie bidimensionnelle :	35
Conclusion générale	36
Références bibliographiques	37
Annexes	43

Liste des abréviations

AcOET : Acétate d'éthyle.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CHCl₃ : Chloroforme.

CH₂CL₂ : Dichlorométhane.

C₆H₅OH : Acide phénique.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

DCM : Dichlorométhane.

HPLC : Phase liquide à haute performance.

IR : Infrarouge.

Liq-liq : Liquide-liquide.

MeOH: Methanol.

Na₂SO₄: Sulfate de sodium.

NH₂: Amide.

P. scoparius : *Pituranthos scoparius*.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

UV : Ultra-violet.

Liste des figures

Figure 1: Les fleurs de la plante.....	4
Figure 2: <i>Pituranthos scoparius</i>	4
Figure 3: Les principaux aglycones des flavonoïdes	7
Figure 4: Les principaux cycles azotés des alcaloïdes.....	9
Figure 5: La structure de base des coumarines	10
Figure 6: La structure des saponines	11
Figure 7: Exemple d'un tanin hydrolysable.....	12
Figure 8: Exemple d'un tanin condensé	13
Figure 9: Stéroïde R = diverses chaînes latérales	13
Figure 10 : La situation géographique de la région de récolte.....	21
Figure 11 : Macération méthanol/eau (originale).	22
Figure 12 : Un rotavapor type (Heidolph) (originale).	22
Figure 13 : Extraction liquide-liquide (originale).....	23
Figure 14 : Une centrifugeuse de laboratoire (originale).....	24
Figure 15 : L'extrait d'éther de pétrole après la centrifugation (originale).	25
Figure 16 : L'extrait de l'acétate d'éthyle (originale).....	25
Figure 17 : L'extrait de n-butanol (originale).....	26
Figure 18 : L'Organigramme d'extraction des différents extraits.	27
Figure 19 : Cuve de développement chromatographie (originale).	29
Figure 20 : L'Organigramme de CCM de différents types de chromatographie.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1 :Classification des terpènes.	10
Tableau 2 :Les rendements des différents extraits :	31
Tableau 3 :Les résultats de la CCM effectuées pour les extraits dans le système solvant (hexane/ acétate d'éthyle) :	32
Tableau 4 :Résultats de la CCM pour les fractions plus le brut :	33
Tableau 5 :Résultats de la CCM pour les phases suivantes :	34

Introduction générale

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Bien qu'une grande partie du XXème siècle a été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [1,2].

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé [3,4].

Pituranthos scoparius est une plante médicinale largement utilisée par la population algérienne, notamment dans la médecine traditionnelle.

L'objectif de notre travail est l'étude des différentes techniques d'extraction, séparation et purification de principe actif de *Pituranthos scoparius*.

Ce travail est scindé en trois parties :

Chapitre I : Généralités sur *Pituranthos scoparius* et les métabolites.

- Chapitre II : Les différentes techniques d'extraction, séparation et purification de principe actif.
- Chapitre III : Les purifications.
 - ✓ La première partie : Le matériel et méthodes.
 - ✓ La deuxième partie : Résultats et discussion.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA PLANTE

I.1- Généralités sur la plante :

Le Sahara, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années.

Pituranthos scoparius est une espèce endémique nord-africaine et est utilisée comme extrait à fort pouvoir antifongique [5].

I.1.1-La famille des Apiacées :

Les Apiaceae (Apiacées) anciennement appelées Ombellifères, comprennent environ 3000 espèces réparties en 469 genres sont distribués dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord. En Algérie 55 genres regroupant 117 espèces, dont 24 endémiques, sont répertoriés [6]. Les Apiaceae sahariennes sont bien différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés sauf la distinction entre les espèces du genre *Pituranthos*. Pour toute identification, il est très important de cueillir des échantillons portant des fruits mûrs [7].

C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Les plantes de la famille des Apiaceae sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles, ou le plus souvent vivaces. L'appareil végétatif souterrain pérennant est très varié : racine pivotante, rhizome ou tubercule.

Les feuilles sont alternes, souvent très découpées, sans stipules, généralement engainantes. Elles sont le plus souvent composées, pennées, palmées ou ternées, plus rarement entières (chez les buplèvres par exemple) ou phyllodiales.

Les fleurs sont généralement blanches et plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées. Leur simplicité et leur régularité caractérisent les Apiaceae ; ainsi, la fleur a toujours la même formule florale : Le calice est constitué de cinq sépales (5S), La corolle est constituée de cinq pétales libres (5P), de type actinomorphe. Androcée est composé de cinq étamines, gynécée ou pistil est composé de deux carpelles (2C) antéropostérieurs soudés à la coupe florale et formant un ovaire infère. Après fécondation, l'ovaire infère devient un diakène ou double méricarpe [8].

Les Racines, tiges et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un

mélange d'essences et de résines, ce qui explique l'odeur forte qui se dégage des Apiaceae lorsqu'on les écrase [7,9].

I.1.2-Description Botanique :

Les Ombellifères sahariennes sont différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile [10].

En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule [11].

Le genre *Pituranthos* possède plus de 20 espèces, dont certains sont spécifiques à l'Afrique du nord [12] [13], et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

Le potentiel floristique Algérien de ce genre comporte les espèces suivantes :

- *Pituranthos Chloranthus*, espèce particulièrement moins présente.
- *Pituranthos Scoparius*, l'objet de notre travail, espèce abondant dans les Aurès.
- *Pituranthos battandieri* (Maire), endémique au Sahara marocain et Oranie.

Quezel [12] a décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, à tiges très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles et des percarpes ovoïdes à 6 bandelettes [14].

I.2-Pituranthos scoparius :

I.2.1-Description de *Pituranthos Scoparius* :

Pituranthos scoparius **Benth. Et Hook**, appelée en arabe « Guezzah » est une plante vivace, aphyllé ou presque, à tiges souvent très ramifiées, Ses tiges décombantes, longues de 40-80 cm, florifères avec des fleurs blanches à ombelles latérales et pédoncule court (1-3 cm). Ses fruits sont plus longs que larges, hérissées de poils dressés. C'est une plante à souche ligneuse ramifiée émettant de nombreuses rosettes de feuilles triséquées 1-2 fois. La floraison a lieu de Février à Octobre [6,15] (Figures 1 et 2) :



Figure 1:Les fleurs de la plante [14].



Figure 2: *Pituranthos scoparius* [14].

I.2.2- Classification de la plante :

D'après, Quzel P .et Santa S., 1963, *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur.) Benth. & Hook est classé comme suit :

-Règne : Plantae (végétal)

- Embranchement : Spermaphytes
- S/embranchement : Angiosperme
- Classe : Magnoliopsida (**Eudicote**)
- Ordre : Apiales
- Famille : Apiacées
- Genre : Pituranthos
- Espèce : scoparius
- Nom binomiale : *Pituranthos scoparius* [16].

I.2.3-Utilisation traditionnel :

L'espèce *Pituranthos scoparius* est appelée localement **Guezzeh**. Les huiles obtenues des tiges et des graines de l'espèce *Pituranthos scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre [17].

Elle est utilisée comme médicament contre [18] :

- _ Les spasmes ;
- _ Les douleurs de diabète ;
- _ Hépatite difficultés digestives ;
- _ Infections urinaires (aromate) ;
- _ Utilisé les huiles contre les bactériales [19,15].

I.3-Les métabolites :

I.3.1-Les métabolites primaires :

Le métabolisme primaire représente tous les processus de base, comme la croissance ou la respiration, qui sont vitaux pour la plante. Les métabolites primaires proviennent de ces réactions et sont les composés essentiels de la machinerie moléculaire de la cellule (acides nucléiques, protéines, lipides et d'hydrates de carbone) [20,21].

I.3.2-Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits [22].

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure dépendant [23].

I.3.2.1- Composées phénoliques :

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes [24,25].

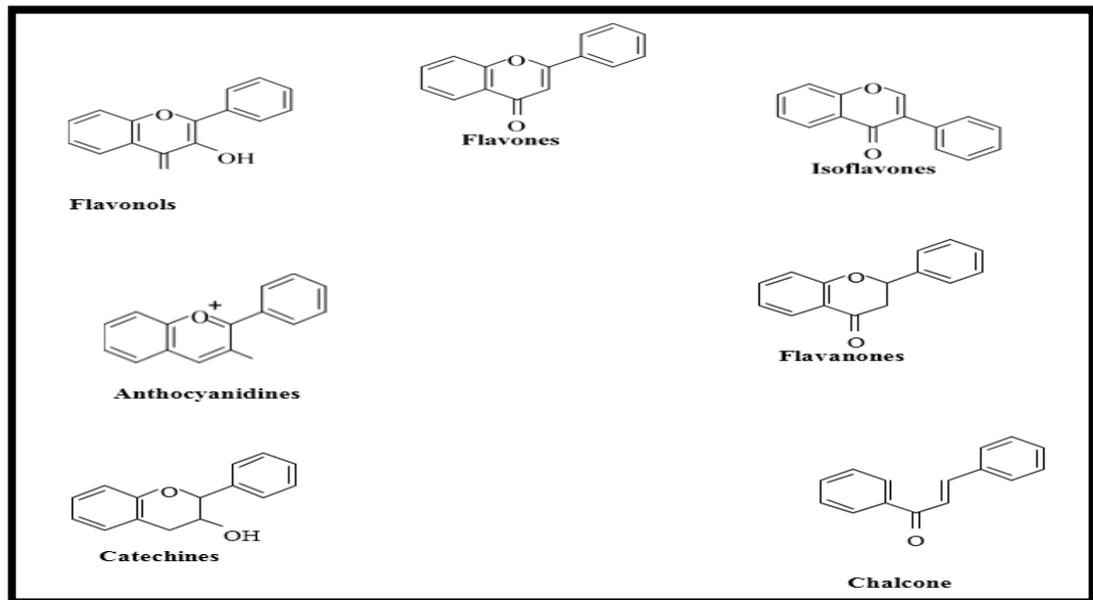
I.3.2.2- Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6). Ces composés existent sous forme d'aglycones (génines) ou sous forme de glycosides et plus de 4000 structures sont connues à ce jour [26]. Les principaux aglycones sont représentés dans la figure 3. Tous les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central [27].

On peut remarquer ici que :

- Les *flavones* sont des 2-phénylchromones, incolores ;
- Les *isoflavones* sont des 3-phénylchromones, beaucoup moins répandues que les Flavones ;
- Les *flavonols* sont des 3-hydroxyflavones. Ce sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glycosides ;
- Les *flavanones* sont des 2,3-dihydroflavones ;
- Les *chalcones* sont des isomères des flavanones avec ouverture du noyau pyronique entre les positions 1 et 2 ;
- Les *anthocyanidols* sont des dérivés réduits des flavonols avec formation d'un oxonium ;
- Les *flavanes* ou catéchines sont également des produits de réduction, au moins formellement, des flavonols.

Les flavonoïdes les plus étudiés appartiennent aux groupes des flavones, des flavonols, en particulier, la quercétine et son hétéroside la rutine, mais aussi à ceux des flavanes, flavanones et chalcones [27,28].



I.3.2.3- Les alcaloïdes :

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote **hétérocyclique**. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et leur véritable valeur ne s'affirme qu'entre les mains du médecin car ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques.

Selon leur composition chimique et surtout leur structure moléculaire, les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes.

- ✓ Des phénylalanines : capsaïcine du piment, colchicine du colchique.
- ✓ Des alcaloïdes isoquinoléiques : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine contenues dans l'opium du pavot, et des alcaloïdes indoliques : ergométrine, ergotamine, ergotoxine de l'ergot des céréales.
- ✓ Des alcaloïdes quinoléiques : tige feuillée de la rue commune.
- ✓ Des alcaloïdes pyridiques et pipéridiques : ricinine du ricin, trigonelline du fenugrec, conine

(Poison violent) de la ciguë, vdes alcaloïdes dérivés du tropane : scopolamine et atropine de la belladone : vdes alcaloïdes stéroïdes : racine de vétrate, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple.

Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont de type (figure 4) : Indole (a), Quinoline (b), Isoquinoline (c), Tropane (d), Pyridine (e), quinolizidine (f), la morphine (g) et solanidine (h) (stéroïde) [29].

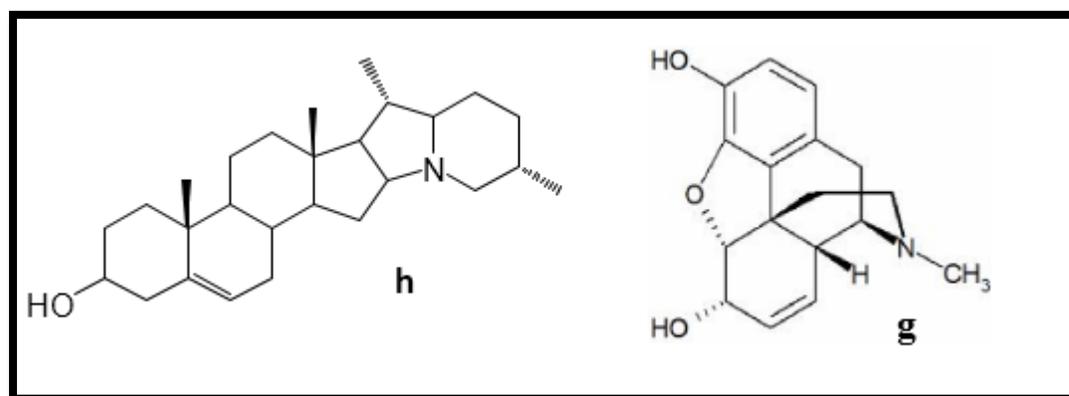
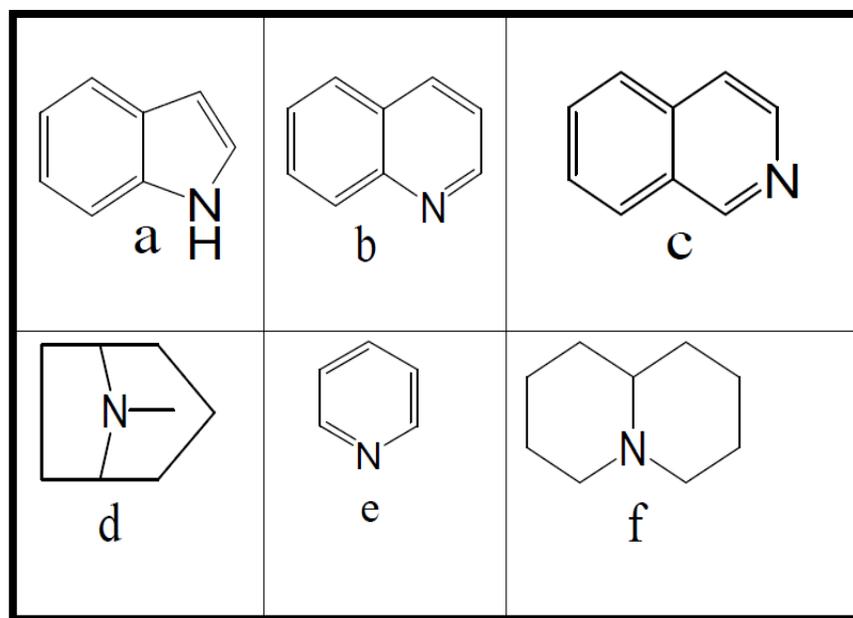


Figure 4: Les principaux cycles azotés des alcaloïdes [29].

I.3.2.4- Les terpènes :

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Ils ont un caractère commun, formés d'**unités isopréniques** (C₅H₈). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (C₅H₈)_n. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien formés des anneaux. De ce fait, une classification rationnelle, basée sur ce nombre qu'ils renferment est possible [30,31] [32](voir le tableau 1) :

Tableau 1 : Classification des terpènes [32].

Monoterpènes	C ₁₀
Sesquiterpènes	C ₁₅
Diterpènes	C ₂₀
Sesterpènes	C ₂₅
Triterpènes et Stéroïdes	C ₃₀
Tetraterpènes	C ₄₀
Polyterpènes	(C ₁₀) _n avec n>8

I.3.2.5- Les coumarines :

Historiquement, le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de tonka. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820. Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclarée et la lavande. On les trouve aussi dans le miel, le thé vert, etc.... Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure, ils sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Zcinnamiques [33].

La structure de base des coumarines est la suivante :

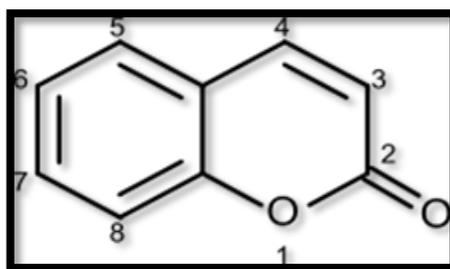


Figure 5: La structure de base des coumarines [33].

I.3.2.6- Les saponines :

Les saponines sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble

complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile [34,35].

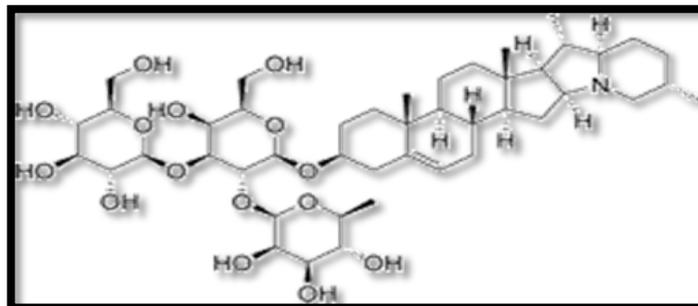


Figure 6: La structure des saponines [35].

I.3.2.7- Les tannins :

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités [36]. Le terme tannin vient de la source de tannins, utilisées pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes.

Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) [37]. Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) [38].

Les tannins sont classés en deux types selon la structure : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

I.3.2.7.1- Les tannins hydrolysables :

Ils sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C₃ de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins. Ces deux

groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables.

Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres). L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C_6-C_3 , comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur [39].

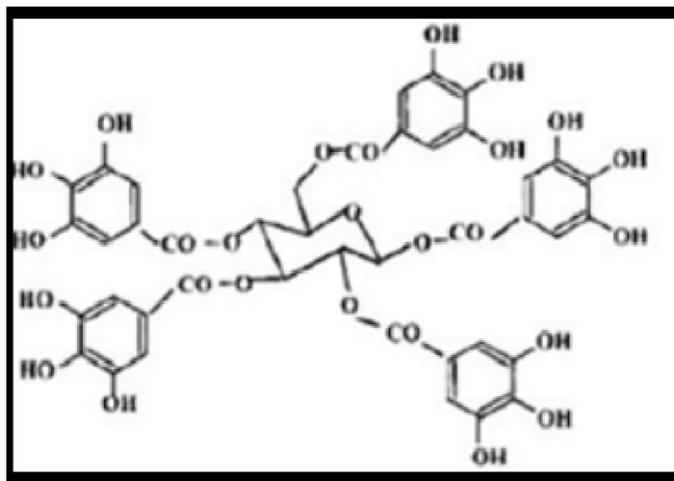


Figure 7: Exemple d'un tannin hydrolysable [40].

I.3.2.7.2-Les tannins condensés :

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols. Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelpinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelpinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine [41]. En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines [42].

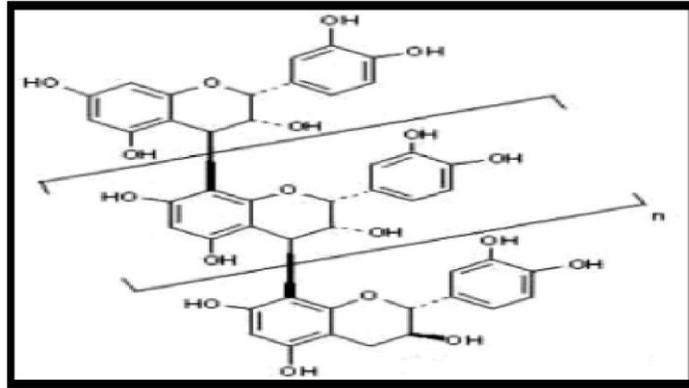


Figure 8: Exemple d'un tanin condensé [43].

I.3.2.8-Les stéroïdes :

Les stéroïdes représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol ou de ses homologues particulièrement abondants dans les végétaux et les animaux. Cette classe de substances naturelles présente une sous-classe de triterpènes, dont la structure chimique, de base et un système tétracyclique. Les quatre cycles sont désignés par les lettres A, B, C, D en débutant par le cycle en bas à gauche [44] comme il est présenté dans la figure 9.

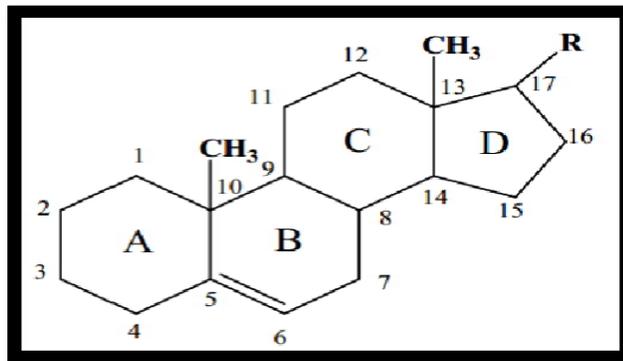


Figure 9: Stéroïde R = diverses chaînes latérales [45,5].

**CHAPITRE II : LES DIFFERENTES TECHNIQUES
D'EXTRACTION ET DE SEPARATION ET
D'IDENTIFICATION DES PRINCIPES ACTIFS**

II.1-Définition :

Un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers [46, 47].

- Purification : des impuretés doivent être extraites du composé d'intérêt
- Concentration : élimination d'une partie du solvant.
- Fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

II.2- Techniques utilisées pour la séparation des principes actifs :

Les principes actifs d'une plante médicinale sont des agents chimiques capables d'une activité. La présence de ces composants souvent en quantité extrêmement faible dans la plante impose des séparations, généralement, délicates. La décoction, l'infusion et la macération sont les méthodes de séparation les très utilisées pour l'extraction globale des principes actifs et qui sont suivies par des séries de séparation chromatographique pour atteindre une matière pure d'un principe actif.

II.2.1-Décoction :

La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans un solvant approprié (généralement l'eau), ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois.

La décoction est utilisée en herboristerie, en teinture, en brasserie et en cuisine. Le terme désigne également les préparations obtenues par cette méthode, généralement des tisanes. La décoction consiste à chauffer l'élément avec de l'eau, jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante, pour en extraire les principes actifs. Plusieurs plantes, feuilles, fleurs, racines etc... Trouvées en herboristerie pour leurs vertus thérapeutiques s'utilisent, entre autres, sous forme de décoctions.

Pour réaliser une décoction, on prépare les parties de plantes recherchées, coupées et fractionnées si nécessaire, et on les place dans un récipient rempli d'eau. Le tout est porté à ébullition et maintenu à température pendant un temps variable, généralement entre deux et quinze minutes. À la fin, on laisse tiédir et on filtre le liquide à l'aide d'une passoire avant de l'utiliser. La décoction ne doit pas être confondue avec l'infusion ni avec la macération.

La décoction permet une extraction des principes actifs plus complète que l'infusion mais ne s'applique pas partout, la température modifiant ou dégradant certains principes. La décoction dure en moyenne quelques minutes [48].

II.2.2- Infusion :

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes [49].

II.2.3-Macération :

Le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre. Dans le cas de la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou 12 heures).

Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine d'heures par risque d'oxydation et de fermentation du liquide [50,51].

II.3- Les techniques de séparation et de purification :

La chromatographie est une méthode physique de séparation 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. 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. Papier). 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 [52].

II.3.1-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 [53].

II.3.2- 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, Schleider 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 si l'on désire une grande vitesse d'écoulement modérée, on utilisera le n°3 ou le n°4 ; 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 [54].

II.3.3-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 phase stationnaire, une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variable (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 [55].

II.3.4- La recristallisation :

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. 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 recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, 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 se cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid [56].

II.3.5- La centrifugation :

La centrifugation est une opération de séparation mécanique, par action de la force centrifuge, de deux à trois phases entraînées dans un mouvement de rotation. On peut séparer deux phases liquides, une phase solide en suspension dans une phase liquide, voire deux phases liquides contenant une phase solide [57].

II.3.6- La filtration :

La filtration est une opération, dont le but est de séparer une phase continue (liquide ou gazeuse) des matières solides ou liquides (phase dispersée) qui y sont présentes en suspension.

La filtration consiste dans le passage de la suspension à travers un milieu filtrant adéquat capable de retenir par action physique, et plus rarement chimique, les particules solides. Le milieu filtrant est constitué par des particules solides, elles-mêmes déposées sur un support qui peut être, selon les cas, des feuilles de papier spécial, des tissus, des toiles métalliques, du sable, des graviers. Pour faciliter l'opération et augmenter la vitesse de passage du liquide, qui dépend de la perte de charge dans les canaux du milieu filtrant, on exerce une aspiration sur le filtre, ou on augmente la pression sur le liquide à filtrer. La filtration continue ou discontinue est utilisée lorsque l'on désire traiter des liquides ou des gaz. Il s'agit en général de traiter des liquides ou des gaz ayant une très petite teneur en solide, en particulier lorsque les particules de solide sont à une faible vitesse de sédimentation [58].

II.4-Les techniques d'analyse et d'identification structurale :

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectroscopie de la masse, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du

carbone.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à la l'élucidation structurale.

L'analyse structurale des flavonoïdes est très délicate, ceci est dû à la grande variété de ces composés [59].

II.4.1-La résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ou ^1H , le carbone treize ^{13}C , le phosphore ^{31}P , le fluor ^{19}F , l'azote ^{15}N ... Depuis son développement extrême durant ces dernières décennies, elle est devenue la méthode de choix de résolution structurale, grâce notamment, aux expériences multi impulsionsnelles et bidimensionnelles homo et hétéros nucléaires qui permettent non seulement d'arriver à la structure mais de résoudre les problèmes de stéréochimie. Il faut également souligner un avantage précieux de cette technique même si elle n'est pas très sensible par rapport aux autres (la spectrométrie de masse par exemple et les séries spectrales UV), c'est que l'échantillon est récupéré intact après évaporation du solvant. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une méthode qui nous informe sur l'environnement des différents protons, elle permet de connaître :

- ✓ La position et le nombre des substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique [60].
- ✓ Le nombre des sucres liés à l'aglycone ainsi que la nature de leur orientation (α ou β).

II.4.2-Spectrophotométrie UV-visible :

C'est la technique la plus utile pour l'analyse des structures flavoniques, plusieurs recherches ont été faites dans ce domaine [61].

Cette technique permet la localisation des hydroxyles libres et de leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduisent sur le spectre UV-visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes

d'absorption par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol [62].

II.4.3- Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus [63]. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduites dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture de liaisons chimique au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des molécules bien déterminés, l'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

Il existe plusieurs modes d'ionisation en spectrométrie de masse dont l'ionisation par Impacte Electronique (IE) pour les molécules thermostables notamment les flavonoïdes aglycones. Pour les molécules thermo instables comme les glycosides des techniques d'ionisation douces sont utilisées dans l'électrospray ou ionisation par électronébulisation (ESI) et la Faste Atom Bombardement (FAB).

Dans ces techniques en mode positif, l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, un ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$. D'autres ions adduits peuvent se former comme $[M+Na]^+$ par addition de chlorure de sodium (NaCl). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié [64].

II.4.4-Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [65]. C'est la technique de séparation la plus utilisée car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. La séparation a lieu dans des colonnes capillaires qui possèdent un fort pouvoir résolutif parfaitement adaptée aux mélanges complexes volatils.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou

plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts IK) ou en programmation de température (indices de rétention, Ir). Cependant, la comparaison des indices de rétention avec ceux de la littérature ne suffit pas à identifier formellement un composé.

Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés de séparation et d'identification des composés volatils [66]. La CPG, est aujourd'hui, un outil incontournable pour l'analyse des composés volatils en mélange [67].

II.4.5-Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC :

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC-High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique, basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne, les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.). Dans nos études, des détecteurs UV basés sur la mesure de la longueur d'onde des composés ont été utilisés [68].

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1-Matériel expérimental :

III.1.1-La récolte :

La plante a été récoltée durant la période de novembre 2017 à la commune d'Oued Zegrir (Guerrara) de la région de Ghardaïa (Algérie). La plante a été déposée au laboratoire de Chimie 1 (à l'Université de Ghardaïa).

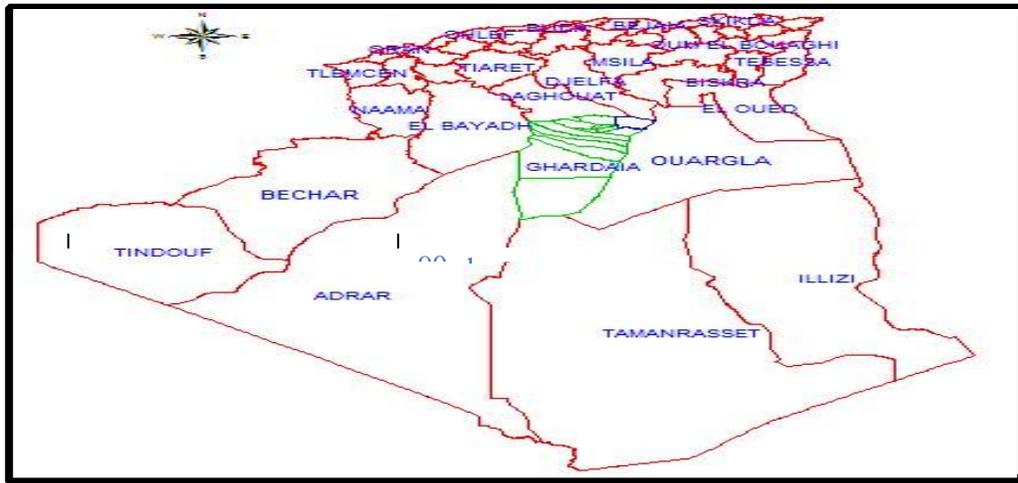


Figure 10: La situation géographique de la région de récolte.

III.1.2-Séchage et conservation :

Le séchage a été effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires presque de 15 jours en moyenne, puis le matériel végétal a été dégradé et conservé dans une bouteille de verre.

III.1.3- Macération :

L'extraction est portée sur la macération, après le séchage de la plante, nous avons pesé 200g de la matière verte (feuilles et tiges). Cette masse est macérée dans 1350 ml d'un mélange méthanol /eau (70/30). Le contenu de la fiole est gardé au repos pendant 48h à température ambiante pour dissoudre les constituants solubles. Cette opération est répétée 2 fois avec le même solvant après sa séparation par filtration.



Figure 11: Macération méthanol/eau (originale).

III.1.4- Filtration simple et évaporation sous vide :

Après la filtration simple sur un papier filtre. On a obtenu une solution d'une couleur vert olive. Une évaporation sous vide a été effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif type (Heidolph) à une température de 55°C R 140 pour récupérer le solvant utilisé durant cette macération (méthanol).

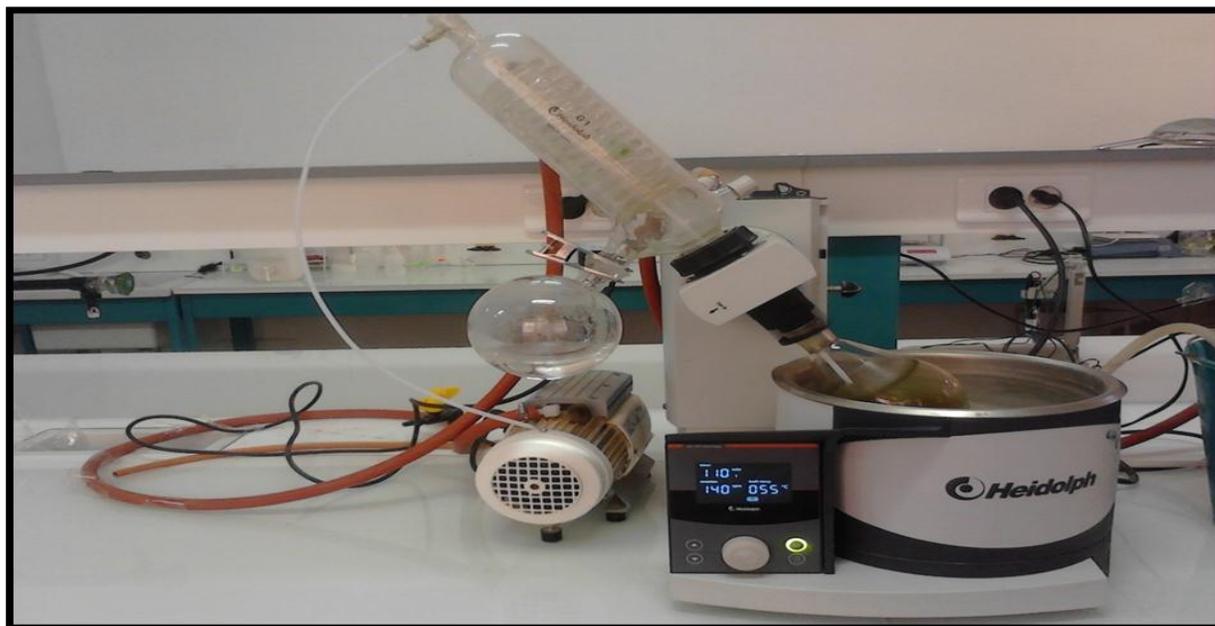


Figure 12: Un rotavapor type (Heidolph) (originale).

III.1.5-Extraction et fractionnement des principes actifs :

Nous procédons ensuite à une extraction liquide/liquide successivement l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, dichlorométhane et n-butanol. Chaque phase séchée par Na_2SO_4 . Les extraits organiques sont évaporés dans un rotavapor type (Heidolph) chaque phase à sa température, l'extrait obtenu a été conservé au 4°C jusqu'à l'utilisation.

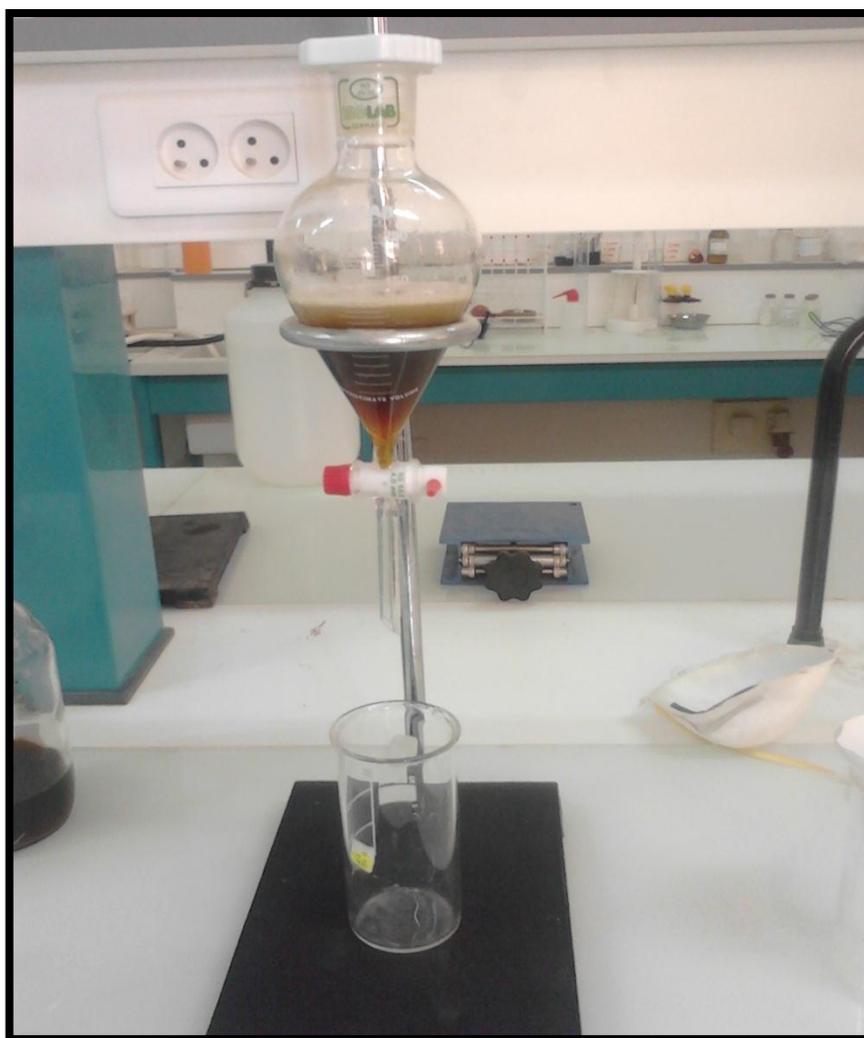


Figure 13: Extraction liquide-liquide (originale).

III.1.5.1- Extraction par l'éther de pétrole :

L'extrait obtenue est 250 ml, nous avons divisé par 3, après on le met dans l'ampoule à décanter.

- Nous avons ajouté 1/3 volume d'éther de pétrole au volume de la phase aqueuse obtenue (v/v).
- Bien agiter et laisser reposer le mélange, au moins 10 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique ou éther de pétrole (coté supérieur) et une phase aqueuse (coté inférieur) ;
- récupérer la phase organique dans un récipient en verre ;
- répéter la procédure trois fois.
- Dans ce cas, nous avons eu des lipides et pour l'enlever, nous avons introduit l'éther de pétrole dans la centrifugeuse.



Figure 14: Une centrifugeuse de laboratoire (originale).

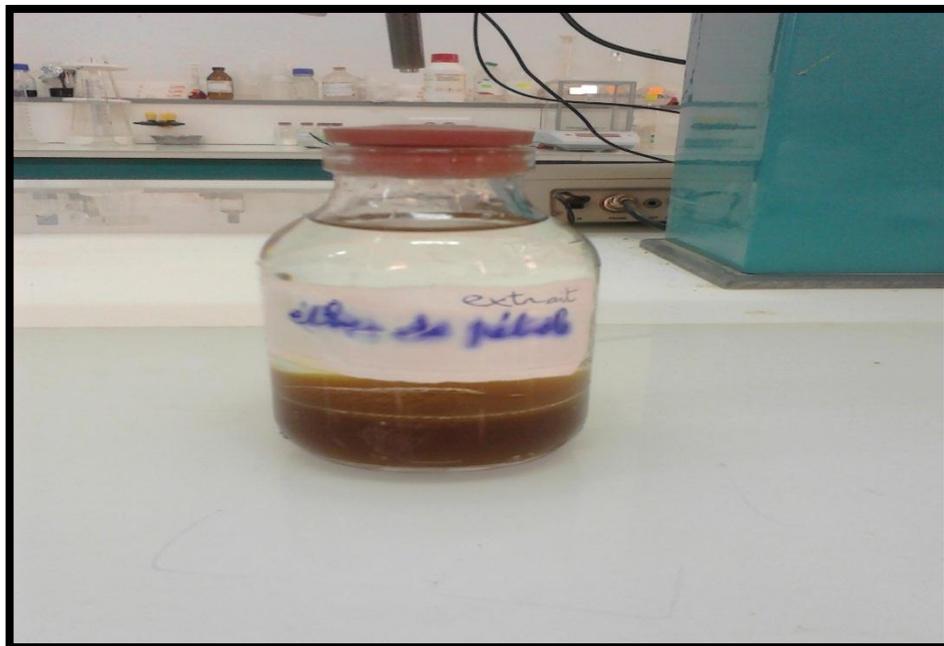


Figure 15: L'extrait d'éther de pétrole après la centrifugation (originale).

III.1.5.2- Extraction par l'acétate d'éthyle :

Dans une deuxième étape, la phase aqueuse résultante de l'étape précédente a été traitée avec l'acétate d'éthyle et on répète les mêmes étapes. La couleur de la phase organique (phase d'acétate d'éthyle) est jaune alors que la phase aqueuse est marron très foncée.

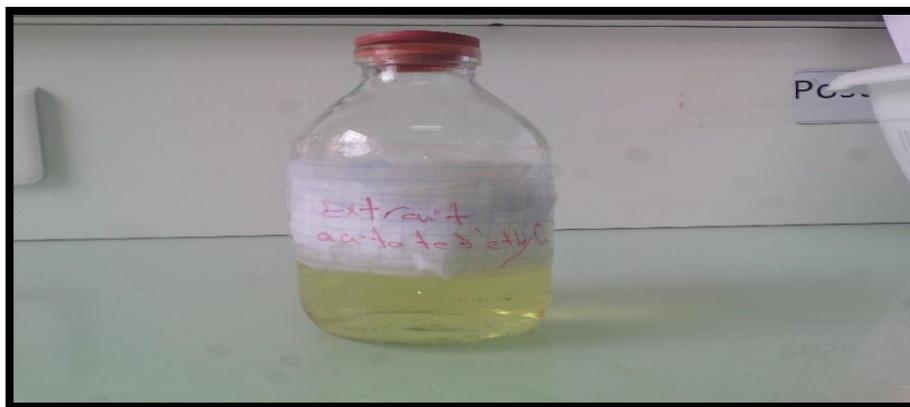


Figure 16: L'extrait de l'acétate d'éthyle (originale).

III.1.5.3- Extraction par dichlorométhane :

Dans une troisième étape, la phase aqueuse résultante de l'étape précédente a été traitée avec DCM et on répète les mêmes étapes. La couleur de la phase organique (phase de DCM) est vert alors que la phase aqueuse est marron très foncée .

III.1.5.4- Extraction par n-butanol :

Finalement, nous avons traité la phase aqueuse récupérée par n-butanol selon les mêmes étapes que nous avons fait précédemment.

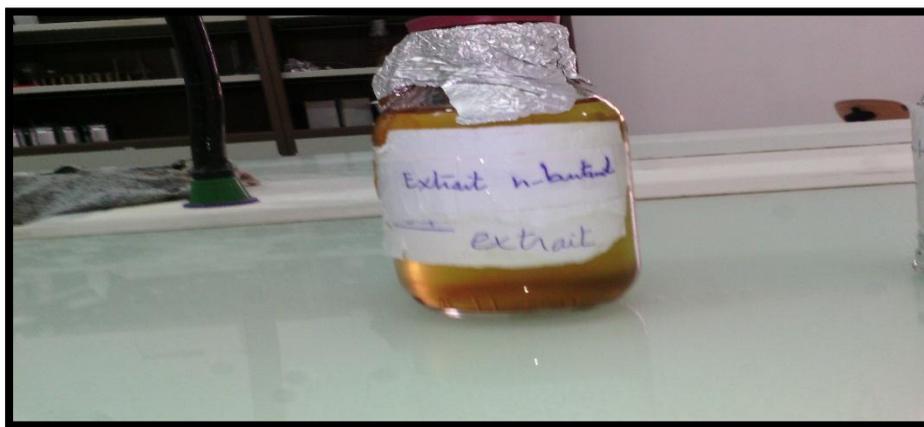


Figure 17: L'extrait de n-butanol (originale).

III.1.6-Le rendement de l'extraction :

Le rendement d'extraction a été déterminé par la formule suivante :

$$R\% = 100 \left[\frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{pv}}} \right]$$

M_{ext} : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

M_{pv} : est la masse de la plante séchée en g.

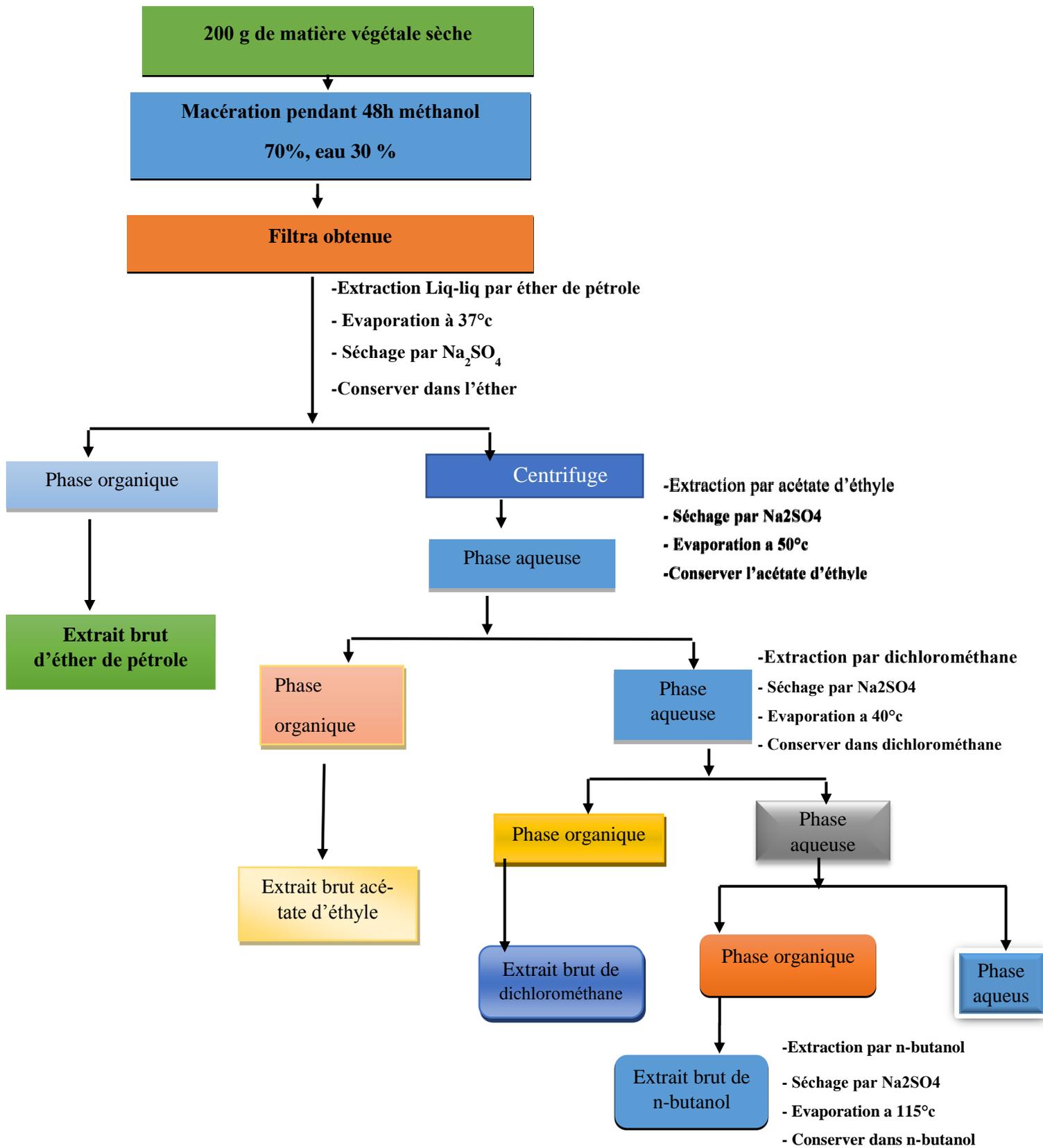


Figure 18 : L'Organigramme d'extraction des différents extraits.

III.2- L'analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques analytiques commerciales 10x6 cm portant 0,25 mm de gel de silice 60F254 et polyamide F254S (Merck, Germany).

Les plaques ont été observées sous lampe UV à longueurs d'ondes : $\lambda = 365\text{nm}$. Chaque substance qui migre est caractérisée par son Rapport frontal (**Rf**) :

$$\mathbf{RF} = \mathbf{d/D}$$

d : Distance parcourue par le constituant.

D : Distance parcourue par le front de l'éluant.

III.2.1-Protocole de CCM sur gel de silice :

-Analyse 1 :

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de silice 60.

Phases mobiles : hexane/acétate d'éthyle à différents pourcentages

Les fractions 1 : acétate d'éthyle et éther de pétrole

Les fractions 2 : phase d'éther de pétrole, phase de acétate, phase de DCM et phase de n-butanol.

-Analyse 2 :

-Phases mobiles :

- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOET}$ (13 :1 :1) (v : v : v)

- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (19 :1) (v: v)

- CH_2CL_2 /Acide acétique / H_2O (2 :1 :1) (v : v : v)

-N-butanol/ AcOET / H_2O (13:3:4) (v : v : v)

- $\text{AcOET}/\text{hexane}$ (1 :1) (v: v)

- $\text{CH}_3\text{Cl}_3/\text{MeOH}$ (14 :1) (v : v)

- L'extrait brut et Les fractions.

III.2.2-Protocole de CCM sur gel de polyamide :

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de polyamide F254S

Phases mobiles : Toluène/ MeOH à différents pourcentages.

L'extrait brut et les fractions.

III.2.3-Chromatographie bidimensionnelle :

Phase stationnaire : plaque en aluminium recouverte de gel de silice 60

Phase mobile :

-Pour la première dimension : $\text{CH}_2\text{CL}_2/\text{MeOH}$ (96 :4)

- Pour la deuxième dimension : $\text{CHCL}_3 / \text{MeOH}/ \text{AcOET}$ (90 :5 :5)



Figure 19: Cuve de développement chromatographie (originale).

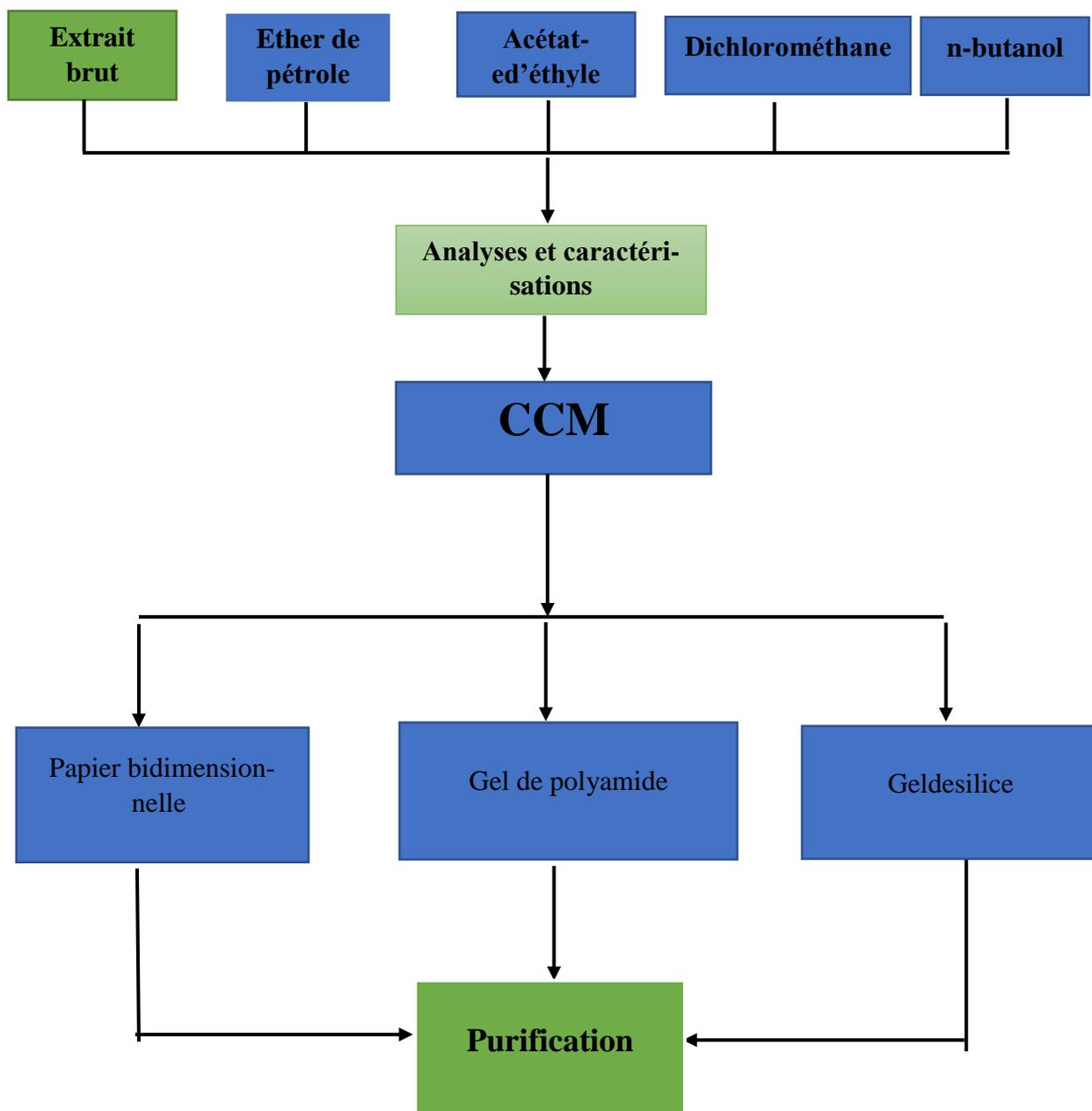


Figure 20:L'Organigramme de CCM de différents types de chromatographie.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1- Fractionnement et analyse chromatographique par la CCM :

IV.1.1-Fractionnement :

Un extrait brut de *P. scoparuisa* a été obtenu par la macération des parties aériennes dans un mélange méthanol / eau (70/30 : v/v). Le fractionnement a été réalisé par le protocole décrit dans la figure de ce chapitre, les différents solvants utilisés nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

-Phase Etherpétrolique: obtenue après l'extraction Liq-liq par l'éther de pétrole.

-Phase d'acétate d'éthyle : obtenue après l'extraction Liq-liq par d'acétate d'éthyle.

-Phase dichlorométhane : obtenue après l'extraction Liq-liq par dichlorométhane.

-Phase de n-butanol : obtenue après l'extraction Liq-liq par n-butanol

IV.1.2-Le rendement de l'extraction :

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2 suivant :

Tableau 2 : Les rendements des différents extraits :

Matériel végétal	Extrait	M(g)	Rendement(%)
<i>Pituranthos scoparius</i>	Etherpétrolique	9.26	4.63
	Acétate d'éthyle	10.46	5.23
	Dichlorométhane	6.065	3.0325
	N-butanol	64.24	32.13
	Brut	21.28	10.64

Dans ce tableau, nous notons que les rendements diffèrent d'un extrait à l'autre : on observe une hausse du n-butanol par rapport aux autres extraits.

D'après ces résultats, il apparaît que l'extrait de n-butanol avec 32.13% d'extraits bruts

présente plus de substance que l'extrait de l'acétate d'éthyle (5.23%), puis suivi d'Etherpetrolique et Dichlorométhane qui ne renferment que 4,63% et 3.0325 d'extrait bruts.

IV.2- Chromatographie sur couche mince :

IV.2.1-Chromatographie sur gel de silice :

Tableau 3 : Les résultats de la CCM effectuées pour les extraits dans le système solvant (hexane/ acétate d'éthyle) :

Hexane : acétate d'éthyle %	Ether de pétrole		Acétate d'éthyle		Dichlorométhane		N-butanol	
	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs
(100 :0)	0.513	Jaune	–	–	–	–	0.386 0.686	Jaune Clair
(90 :10)	–	–	0.163	Jaune	–	–	–	–
(80 :20)	0.357 0.413 0.5 0.75	Jaune Bleu Mauve Vert	0.125 0.225 0.438	Jaune Vert Vert clair	–	–	–	–
(70 :30)	0.338	Bleu	0.15 0.338	Vert Jaune	0.263 0.575	Jaune	–	–
(60 :40)	0.488 0.55 0.788	Jaune Mauve Vert	0.138 0.263	Vert Vert	–	–	–	–
(50 :50)	0.6 0.75 0.813	Mauve Jaune Vert	0.125 0.438 0.663	Vert Jaune Vert	–	–	–	–

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Par comparaison des rapports frontaux des taches apparues dans les fractions, Notez que (80 :20) et (50 :50) nous a donné les meilleurs rapports frontaux et aussi donne des couleurs déférents.

Dans ce cas, nous disons que le solvant (hexane /acétate d'éthyle) donne le meilleur résultat à (80/20) par la fraction d'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole.

Tableau 4: Résultats de la CCM pour les fractions plus le brut :

Phases mobiles	Extraits									
	Brut		Ether de pétrole		Acétate d'éthyle		Dichlorométhane		N-butanol	
	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs
CHCl₃/MeOH/AcOET (90 :5 :5) %	0.1 0.55 0.588 0.688	Bleu	1	Bleu	0.213 0.275 0.438 0.525 0.575 0.713	Jaune Jaune Jaune Vert Mauve Vert	0.3	Jeune	-	-
CHCl₃/MeOH (96 :4) %	0.838	Jaune	0.975	Vert	0.975	Jeune	0.688	Mauve	-	-
CH₂CL₂ /Acide acétique /H₂O (2 :1 :1) %	0.4	Jeune	0.475	Bleu	0.975	Jeune	0.813	Mauve	-	-
N-butanol/AcOET / H₂O (65 :15 :25) %	0.613	Vert	0.783	Vert	0.188 0.238 0.588 0.675 0.738 0.788 0.863	Mauve Jaune Jaune Vert Mauve Mauve Vert	0.138	Jeune	-	-

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

AcOET /hexane (1 :1) %	0.313	Vert	0.783	Vert	0.625	Vert Jaune	0.22	Mauve	-	-
	0.538				0.888					
CHCl3 /MeOH (92 :8) %	0.275	Vert	1	Vert	0.313	Mauve Jaune Jaune Vert Vert Mauve	0.4	Vert	-	-
					0.413					
					0.663					
					0.875					
					0.938					
					0.963					

Dans ce tableau la meilleure séparation et migration a été obtenue avec le système :

N-butanol/ AcOET / H₂O (65 :15 :25) %.

L'acétate d'éthyle est riche en différents composés puisqu'en pu voir 7 spots qui sont presque identiques entre le jaune, mauve et vert.

IV.2.2-Chromatographie sur gel de polyamide :

Tableau 5: Résultats de la CCM pour les phases suivantes :

Toluène/ Méthanol%	Acétate d'éthyle		Dichlorométhane		N-butanol		Extrait brut	
	Rf	Cou- leurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs	Rf	Couleurs
(100 :0)	0.125	Bleu	-	-	-	-	0.175	Bleu
(90 :10)	0.2 0.588	Jaune Mauve	0.563	Mauve	0.463	Vert	0.875	Vert
(80 :20)	0.113 0.438	Jaune Bleu	0.538	Mauve	0.438	Bleu	0.188 0.85	Jaune Vert
(60 :40)	0.188 0.463	Jaune Vert	0.5	Mauve	0.475	Vert	0.975	Bleu

La meilleure séparation a été obtenue sur polyamide F254S avec phase mobile : (Toluène/Méthanol : 90 :10).

Des différentes couleurs caractéristiques des flavonoïdes ont été observées, il peut s'agir des flavonols pour le jaune ; flavanones et aurones pour le vert, chalcone pour le mauve et methoxyflavonols pour le bleu.

Le polyamide donne une bonne migration.

À l'œil nu : si les taches sont colorées.

IV.2.3-Chromatographie bidimensionnelle :

Après le développement des chromatogrammes, qui ont la phase d'acétate d'éthyle, qui a duré pour la première dimension 80 min et pour la deuxième dimension 60 min, les taches ont été délimitées sous la lumière UV à $\lambda = 365$ nm.

D'après l'observation, des chromatogrammes sous lampe UV, les résultats présentent une bonne migration ; par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques. Les taches sont bien distinctes et montrent une richesse considérable de l'extrait analysé en substances flavonoïques. Partant de leurs fluorescences et Rf, l'échantillon est riche en flavones en premier lieu qui correspondent à tâches violettes, jaunes et bleues.

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'étudier le principe actif de la plante *Pituranthos scoparius* récolté dans la région de Ghardaia (Guerrara).

La détermination de la composition chimique d'un extrait utilise des différentes méthodes de séparation et purification, telles que la chromatographie sur couche mince de gel de silice et gel de polyamide.

Ce travail consiste à la purification et la caractérisation chimique de principe actif de l'extrait alcoolique de cette plante.

A partir de cette étude, il paraît que l'extrait de l'acétate d'éthyle de cette plante peut avoir le résultat acceptable dans ce domaine.

Le gel de polyamide nous a donné un bon résultat, donc on néglige l'analyse de CCM par gel de silice et cuve de développement.

En perspective, nous pouvons lancer ultérieurement une étude très profonde dans ce domaine pour décrire d'une manière claire cet effet par les différentes méthodes de séparation et purification.

Références bibliographiques

- [1] GONZALE, A. G., BERMEJO-BARRERA, J., GARCIA, T. Z. and ROSAS, F. E, Sesquiterpene lactones from *Centaurea species*. *Phytochemistry*, 23, 2071-2072. (1984)
- [2] BOUTAOUI. N, Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae) Etude de la phase acétate d'éthyl. UniversitéConstantine I, (2012).
- [3]CHEBIL L. (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy
- [4] BOUSSAID M, Etude phytochimique et activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de l'extrait de tannins de *Pituranthos chloranthus* (Ghezzeh). Université de Tlemcen-Abou-Bekr Belkaïd. (2013).
- [5]KARZIKA K, evaluation de l'activite antioxydante de quelque metabolites secondaires d'une plante pituranthos de la region de ghardaïa. (2017).
- [6] QUEZAL, P., SantaS. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tom1, Tom2). Ed du Centre National de la Recherche Scientifique. (1962-1963)
- [7] OZENDA P.- Flore du Sahara. Ed. 2. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS.), Paris : 401. , (1983)
- [8] DEYSSON G- Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris, 529 pp. (1979).
- [9] HAMMOUDI R, Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Doctorat (2015).
- [10] OZENDA, P. Flore et Végétation du Sahara, 1991, Ed. CNRS Paris France.
- [11]HABA, H. Thèse de magister chimie, Univ.Batna Algérie(2002)

- [12] QUEZEL, F et Santa, S. Nouvelle Fleur de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol.1-2 Ed. CNRS, Paris France.
- [13] NEGER, R. Petit Flore des Régions Arides du Maroc Occidental, Tome 2 Ed. CNRS, Paris France.
- [14] HAMEURLAINE S, Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa. Université de Kasdi Merbah –Ouargla (2009).
- [15] ADIDA, Etude. Des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de *Pituranthos scoparius* Benth Hook « Guezzah » : plante médicinale endémique de Sahara, université de Aboubaker Belkaïd Tlemcen, Doctorat (2015)
- [16] TAHRAOUI, F. Contribution à l'étude phytochimique et activités antioxydante d'extraits de *Pituranthos scoparius* (Guezzah) par la méthode de réduction du fer : FRAP. Université Aboubaker Belkaïd-Tlemcen (2013)
- [17] NAIT SAID. N. Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes : *Pituranthos chloranthos* et *Marrubium vulgare*, Mémoire de Magister d'Université EL-Hadj Lakhdar-Batna.(2007)
- [18] VICTORIA H, KHADRA M. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. of Ethnopharmacology* 105 358–367. (2006)
- [19] BOURAGAN N, NACER A, KABOUCHE Z, and B. Ait-Kaki. COMPARATIVE antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian septentrional sahara. *Chemistry of natural compounds*. 40. 6, (2004).
- [20] MACHEIX J. J., FLEURIETA. Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (2005)
- [21] Camille Bénard, Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de cultures sur le contenu en polyphénols chez la tomate, Nancy Université – INRA Agronomie et Environnement Ecole doctorale RP2E, (2009).
- [22] JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A. et STEVENS P ; Botanique Systématique : une perspective phylogénétique ; Ed 1 : DEBOECK ; p : 84-336. (2002)

- [23] MAKKAR H.P.S., SIDDHURAJU P. ET BECKER K; Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393; Ed: HUMANA PRESS; p: 67-111. . (2007)
- [24] WALTON N.J. Et BROWN D.E; Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14. (1999)
- [25] ATTOU Amina. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN, Magister (2011).
- [26] GERT, F. ET STEPHAN, M. Metabolit engineering and applications of flavonoids. Current Opinion in Biotechnology .12:155-160. (2001)
- [27] Bruneton, J.Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} édition. Tec & Doc. Paris. (1993).
- [28] BOUCHOUKA E, Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR –ANNABA, doctorat (2016).
- [29] Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC *Anticancer Res.*; 18:471.3. (1998)
- [30] Qureshi. N., Porter. J. W. (1981) In Biosynthesis of isoprenoid Compounds; Porter. J. W., Spurgeon. S. L. Eds; Wiley: New York, Vol 1, pp 47-94
- [31] Cram, D. G. and Mahmoud, G. S; *Chimie organique* 2^{ème} édition. Quatre-villars. P 918-930. (1968)
- [32] Seghiri Ramdane, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis* , Université Mentouri – Constantine, Doctorat .
- [33] J. Bruneton, Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée. Paris, France, p1288.2009
- [34] R.J. Wallace, Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of Nutrition Society, vol. 63, 2004, pp 621–629.
- [35] MECHERI Abd elaziz, Efficacité anticorrosive des extraits de la plante *Pituranthos scoparius* par la méthode gravimétrique : Etude comparative. Université Larbi Tébessi-Tébessa (2016).

- [36] Harborne J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod*; 14: 83-98.Rep (1997)
- [37] Hagerman A. E. and Butler L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem*; 256: 4494-4497. (1981)
- [38] Horn, J., Hayes, J., Lawless, HT. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chem. Senses* 27 (7): 653-9. (2002)
- [39] Seigler DS. *Plant secondary metabolism*. Ed. Kluwer Academic, Boston, 1998, p. 193205.
- [40] Séverine Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants .Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat .Univercité de Toulouse : 58-60-62. (2008).
- [41] Sarni-Manchado P and Cheynier V. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10. 2006,
- [42] Andersen YM and Markham KR. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL p. 553-616, (2006)
- [43] GILBERT B. L., NORRIS D. M., Achemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. *J Insect physiol*. Vol. (14) : 1063-1068. (1968)
- [44] Klyne,W., Tame, N.D. *La chimie des stéroïdes*, Paris, 13, (1966).
- [45] Baker,R. A., Evans, D.A., Grayson,D.D.H.,Jonees, R.C.F.,Lough, A.K.,Moore,P.R., Thaller, V. *Aliphatic and related natural product chemistry*, (1979).
- [46] C.JudsonKing, *SeparationProcesses,Introduction,Wiley-VCHVerlag GmbH & Co, coll. Ullmann's Encyclopedia of IndustrialChemistry*,(2002).
- [47] G. Mahuzier, *Méthodes de séparation, ed.Maçon.*; (1978)
- [48] A. Sophie, N. Eherhart, *La phytothérapie se soigner par les plantes, ed.Eyrolles* ; (2003)
- [49] Sofowera A *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*.Karthala, *Economie et Développement*. Paris : 384. (2010)
- [50] Pierre M., Lis .M *Secrets des plantes*. Editions Artemis, Paris 1 : 463. (2007)

- [51] LEHOUT R et LAIB. Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herbaalba Asso*. Université des Frères Mentouri Constantine. Master (2015)
- [52] BOUTAOUI NASSIMA, Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae) Etude de la phase acétate d'éthyl, UNIVERSITE CONSTANTINE (2012).
- [53] Zanolì P., Avallone R., Baraldi M, *Fitoterapia*, 71(suppl I), 123. (2000)
- [54] Avallone R., Zanolì P., Puia G., Kleinschnitz M., Schreiers P., Baraldi M, *Bio. Pharm.*, 59(11), 1394. (2000)
- [55] Della L., Ubaro A., Di P., Zilli C., Del Negro P, *Progr. Clin. Biol. Res.* (213), 484, (1986),
- [56] Viola H., Marder M., Wolfman C., Wasowski C., Medina J.H., Paladini A.C. *Ann. Asoc. Qui. Age.*, 86(3-6), 236. (1998),
- [57] https://www.emse.fr/~brodhag/TRAITEME/fich4_5.htm
- [58] Emilian Koller, Aide-mémoire Génie chimique, 3^e édition, p161.
- [59] Bronze, M.R. and Boas, L.F.V., characterization of brandies and wood extracts by capillary electrophoresis. *Analisis*. 26(1), p 40, (1998).
- [60] Rodriguez, E., Carman, N.J, et Mabry, J.P., *phytochemistry*, 11, 409, (1972).
- [61] Harbone, J.B., comparative biochemistry of flavonoids, academic press. (1967).
- [62] Harbone, J.B, Mabry, T.J and Mabryn, H., the flavonoids, tom II, academic press (1975).
- [63] Wilson, R.G, Bowie, J.H. ET Williams, D.H., *Tetrahedron*, 24, 1407, (1986).
- [64] Bezzaz Noureddine, Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*, Université de M'sila (2014).
- [65] Arpino P., Pervot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed. Masson, Paris, p. 700. (1995)

[66] Tranchant J., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 4ⁱème édition. Ed. Masson, Paris-Milan-Barcelone, p. 699. +. (1995)

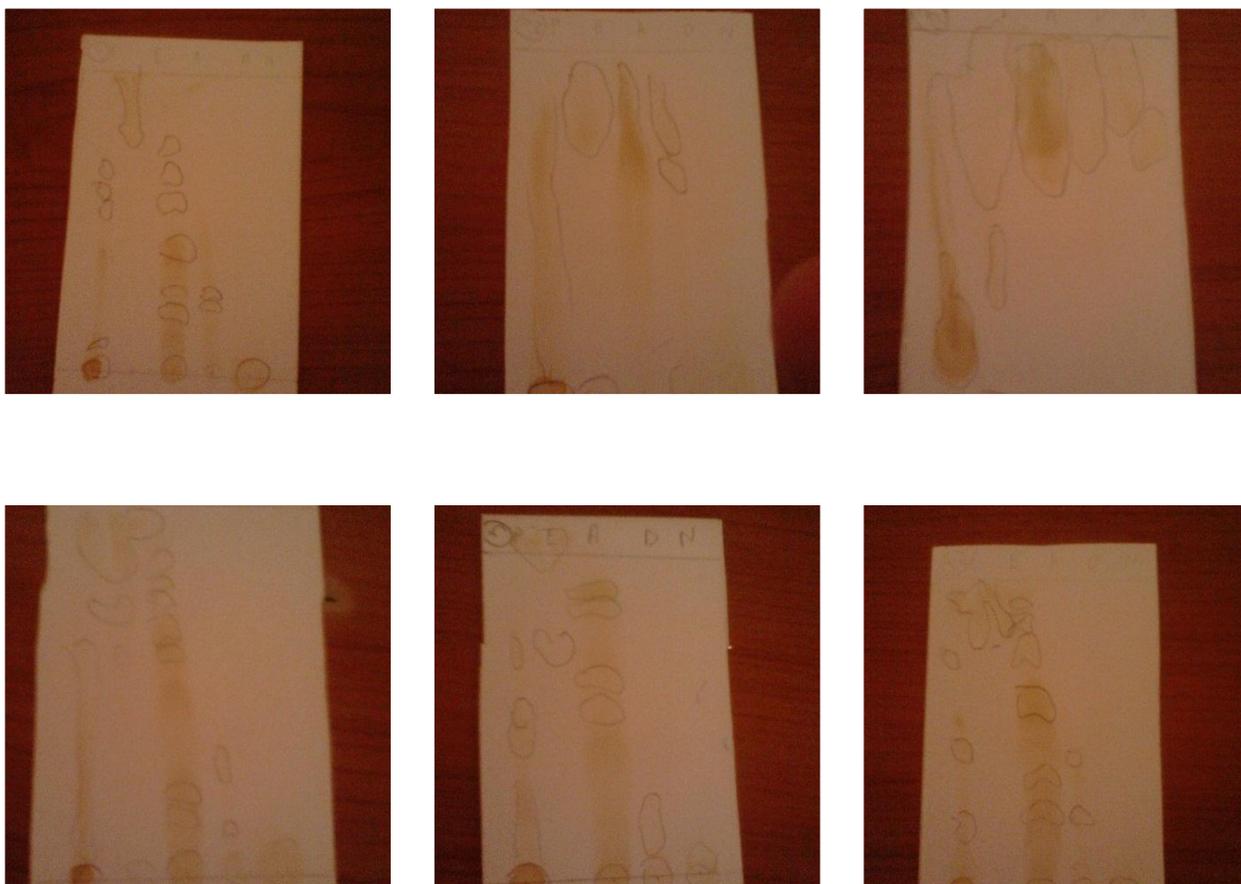
[67]DJABOU. N. Caractérisation et variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de corse et de l'ouest algérien, université abou berk belkaid – Tlemcen, thèse (2012).

[68] Petko Ivanov PENCHEV. 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, université de Toulouse, thèse (2010).

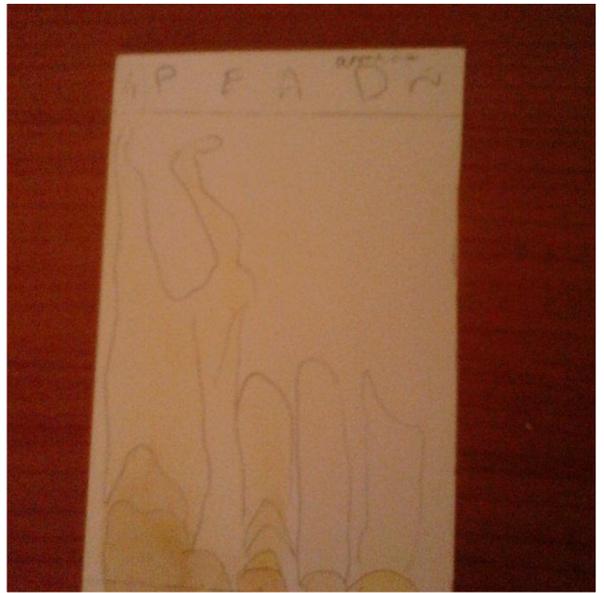
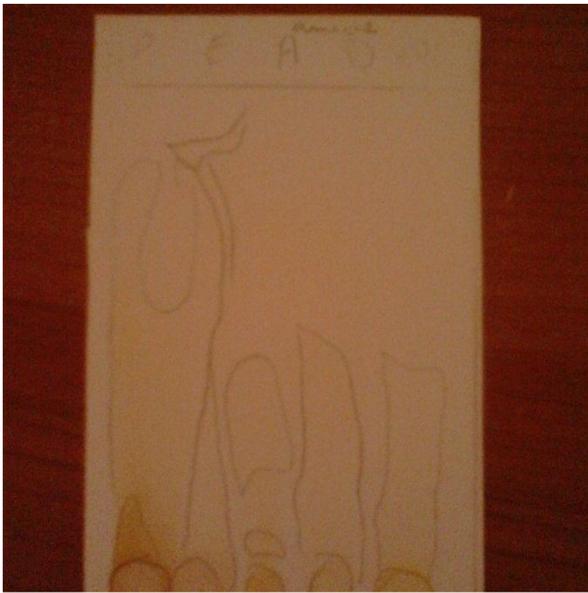
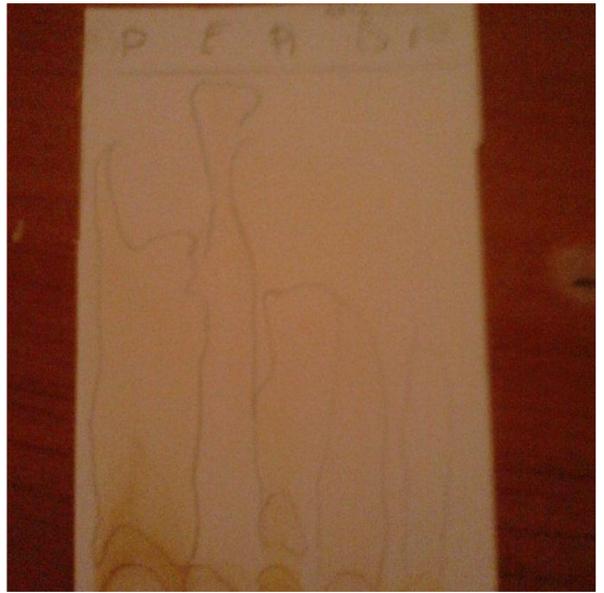
ANNEXES



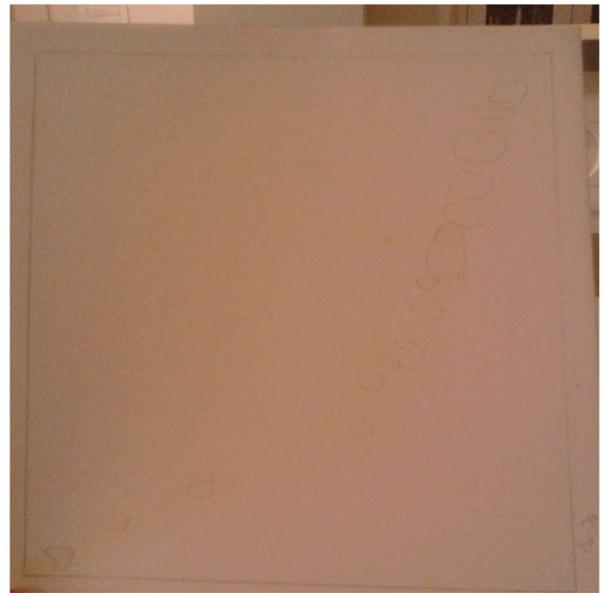
Annexe 1 : Les analyses 1 des plaques CCM de gel de silice pour les fractions.



Annexe 2 : Les analyses 2 des plaques CCM de gel de silice pour les fractions et l'extrait brut.



Annexe 3 : Les analyses des plaques CCM de gel de polyamide pour les fractions et l'extrait brut.



Annexe 4 : les plaques CCM de cuve de développement de chromatographie.