

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

**Université 08 Mai 45 de Guelma**

**Faculté des mathématiques et de l'informatique et des sciences de la matière  
Département des sciences de la matière**

**Mémoire de fin d'études**

**Master II**



**Spécialité : chimie physique**

**Présenté par : SELLAOUI Hadjer et MERZOUGUI Khawla**

---

---

**Recherche et détermination structurale du métabolisme  
flavonique de l'espèce Globularia Alypum.**

---

---

**Sous la direction de :**

**Dr.KOLLI Elhadj**

---

**Juin 2019**

---

## **DÉDICACES**

***À MA CHÈRE MÈRE***

***À LA MÉMOIRE DE MON PÈRE***

***QUI M'ONT AIDÉ À ÊTRE CE QUE JE SUIS, AVEC  
TANT D'AMOUR ET D'AFFECTION.***

***À MES CHERS FRÈRES ET SŒURS AINSI QUE  
LEUR PETITE FAMILLE POUR LEUR AIDE ET LEUR  
SOUTIEN MORAL.***

***À TOUS CEUX QUI M'ONT CONSACRÉ TEMPS,  
PATIENCE ET CONSEILS SURTOUT DANS LES  
MOMENTS DIFFICILES.***

***À TOUTE MA FAMILLE ET À TOUS CEUX QUI ONT  
CONTRIBUÉ UN JOUR À MON  
ÉDUCATION.***

## REMERCIEMENTS

CE TRAVAIL A ÉTÉ RÉALISÉ AU SEIN DU  
LABORATOIRE DE PÉDAGOGIE DE SCIENCE DE LA  
MATIÈRE À L'UNIVERSITÉ O8 MAI 1945 GUELMA.

JE VOUDRAIS ADRESSER MES PROFONDS  
REMERCIEMENTS À MONSIEUR LE DR :

KOLLI EL HADJ D'AVOIR ACCEPTÉ LA DIRECTION  
DE CE MÉMOIRE, POUR SON AIDE, POUR M'AVOIR  
DONNÉ LA POSSIBILITÉ DE RÉALISER CE  
TRAVAIL DANS UN ENVIRONNEMENT AUSSI  
ENRICHISSANT TANT SUR LE PLAN SCIENTIFIQUE  
QUE PERSONNEL, PAR SES CONSEILS ET SES  
ENCOURAGEMENTS.

J'EXPRIME MES SINCÈRES REMERCIEMENTS AUX  
MEMBRES DU JURY POUR L'ATTENTION QU'ILS  
ONT PORTÉ À NOTRE TRAVAIL.

NOUS REMERCIONS TOUT LE PERSONNEL DU  
LABORATOIRE POUR SA CONTRIBUTION AU  
SUCCÈS DE MON TRAVAIL.

ENFIN, J'EXPRIME DE VIFS REMERCIEMENTS AUX  
PERSONNES QUI ME SONT PROCHES ET QUI ONT  
CONTRIBUÉ PAR LEURS SOUTIENS À  
L'ABOUTISSEMENT DE CE TRAVAIL.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**UV** : ULTRA-VIOLET

**°C** : DEGRÉ CELSIUS

**%** : POURCENTAGE

**ML** : MILLILITRE

**MG** : MILLIGRAMME

**V/V** : VOLUME/VOLUME

**$\lambda$**  : LONGUEUR D'ONDE

**C** : CARBONE

**NAOH**: HYDROXIDE DE SODIUM

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**: ACIDE BORIQUE

**ALCL<sub>3</sub>**: CHLORURE D'ALUMINIUM

**MEOH**: MÉTHANOL

**HCL**: ACIDE CHLORHYDRIQUE

**ACOET**: ACETATE D'ETHYLE

**CH<sub>3</sub>COOH**: ACIDE ACÉTIQUE

**NA<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: SULFATE DE SODIUM ANHYDRE

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: ACIDE SULFURIQUE

**CCM**: CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

**RMN** : RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

## LISTE DES FIGURES :

N° des figures	Titre	Page
I.1	Noyauflavone	03
I.2	Noyauflavane	03
I.3	4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone	04
I.4	flavanone	04
I.5	flavone	05
I.6	flavonol	05
I.7	Flavonone	05
I.8	biflavonoïdes	06
I.9	chalcone	06
I.10	aurone	07
I.11	isoflavone	07
I.12	neoflavone	08
I.13	Squelette de base des flavonoïdes	08
I.14	la biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999)	09
I.15	la bande caractéristique d'un squelette flavonique	11
II.1	<i>Globularia alypum</i> L.	18
II.2	Aspect morphologique de <i>Globularia alypum</i> L	19
III.1	Localisation de la wilaya d'Oum El-Bouaghi en Algérie	23
III.2	Localisation de la commune de BirChouhada dans la wilaya d'Oum El-Bouaghi	24
III.3	la plante <i>Globularia alypum</i> L	24
III.4	Evaporateur rotatif	25
III.5	Protocole de préparation de différents extraits de la partie <i>Globularia alypum</i> L	26
III.6	Chromatographie sur colonne	29
III.7	Structure partielle du composé FB2	34
III.8	Structure partielle du composé FG2	39
III.9	4', 5,7-trihydroxyflavone	41

### Liste des Tableaux :

N° des tableaux	Titre	Page
<b>I.1</b>	les activités biologiques, des composés polyphénoliques	<b>10</b>
<b>I.12</b>	relation entre le maximum d'adsorption en UV et le type de flavonoïdes	<b>12</b>
<b>I.3</b>	Déplacement des bandes 1 et 2 dans les différents réactifs	<b>13</b>
<b>I.4</b>	Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A	<b>14</b>
<b>I.5</b>	Les déplacements chimiques et constants de couplage des protons du noyau B	<b>15</b>
<b>II.1</b>	Description de <i>Globularia alypum</i>	<b>19</b>
<b>II.2</b>	études antérieures sur l'espèce <i>Globularia alypum</i>	<b>21</b>
<b>III.1</b>	Résultats des fractions récoltées de la colonne de l'extrait chloroformique <i>Globularia L</i>	<b>27</b>
<b>III.2</b>	les masses des différentes fractions obtenues	<b>28</b>
<b>III.3</b>	Chromatogrammes des fractions de la colonne	<b>30</b>
<b>III.4</b>	Regroupement des fractions issues de la colonne	<b>30</b>
<b>III.5</b>	systèmes de solvants utilisés pour la CCM	<b>31</b>
<b>III.6</b>	Plaque sous lampe UV, $\lambda = 312$ nm	<b>32</b>
<b>III.7</b>	Plaque sous lampe UV, $\lambda = 254$ nm	<b>32</b>
<b>III.8</b>	Chromatogrammes des produits isolés	<b>33</b>
<b>III.9</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le MeOH	<b>34</b>
<b>III.10</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le (MeOH+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	<b>34</b>
<b>III.11</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le MeOH+ AlCl <sub>3</sub>	<b>35</b>
<b>III.12</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le AlCl <sub>3</sub> + HCl	<b>36</b>
<b>III.13</b>	Plaque sous lampe UV, $\lambda = 254$ nm	<b>37</b>
<b>III.14</b>	Plaque sous lampe UV, $\lambda = 312$ nm	<b>37</b>
<b>III.15</b>	Chromatogrammes des produits isolés	<b>38</b>
<b>III.16</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregistré dans le MeOH	<b>38</b>
<b>III.17</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregistré dans le MeOH+NaOH	<b>39</b>
<b>III.18</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregistré dans le MeOH+AlCl <sub>3</sub>	<b>40</b>
<b>III.19</b>	Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregistré dans le AlCl <sub>3</sub> +HCl	<b>40</b>

## SOMMAIRE

Dédicace

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**INTRODUCTION GÉNÉRALE..... 1**

Références bibliographiques.....2

### **Chapitre 1 : Rappels bibliographiques sur les flavonoïdes**

**I.1. Introduction.....3**

**I.2. Définition .....3**

**I.3. Classification des flavonoïdes.....4**

a. Flavones et flavonols .....4

b. Flavonones et dihydroflavonols.....4

c. Bi flavonoïdes.....5

d. Chalcones et aurones.....5

e. Isoflavone et neoflavone.....7

**I.4. Biosynthèse des flavonoïdes.....8**

**I.5. Intérêt biologique des flavonoïdes.....10**

**I.6. Méthodes d'analyses structurales.....11**

a. La spectrophotométrie UV-visible.....11

➤ Protocole .....12

➤ Lecture des spectres.....12

➤ Interprétation des spectres .....13

b. La Spectrométrie de Masse (SM).....14



c. La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	14
Référence Bibliographique.....	17

## **chapitre II : Genre Globularia et travaux effectués sur l'espèce GlobulariaAlypum**

<b>II.1.Introduction .....</b>	<b>18</b>
<b>II.2.Description botanique et répartition géographique .....</b>	<b>18</b>
<b>II.3.Classification botanique.....</b>	<b>19</b>
<b>II.4.Etude chimique antérieures sur le genre.....</b>	<b>20</b>
<b>II.5.Etude chimique antérieure .....</b>	<b>21</b>
Référence Bibliographique.....	22

## **chapitre III : Etude phytochimique et discussion des résultats**

<b>III .1.Introduction .....</b>	<b>23</b>
<b>III.2. dénomination.....</b>	<b>23</b>
<b>III.3. Récolte du matériel végétal.....</b>	<b>23</b>
<b>III.4. Préparation du matériel végétal .....</b>	<b>24</b>
<b>III.5. Extraction de la plante.....</b>	<b>25</b>
III .5.1. Extraction solide/liquide.....	25
III.5.2. Extraction liquide/liquide.....	25
<b>III.6. Séparations chromatographiques.....</b>	<b>27</b>
III.6.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	27
III6 .2. Séparation chromatographique sur couche mince .....	31
<b>III .7. Détermination structurale des produits isolés.....</b>	<b>31</b>
III.7.1. Etude de la fraction B .....	31
III.7.2.Identification structurale du composé FB1.....	33

III.7.3.Etude de la fraction G .....	36
III .7.4.Identification structurale du composé FG2.....	38
Référence Bibliographique.....	42

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Les plantes sont toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites [1].

L'Algérie bénéficie d'un climat favorable qui permet le développement d'une flore très riche et hautement variée où on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique et phytothérapie [2].

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux " compounds", si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires [3].

Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été étudiées sur les plans phytochimique et pharmacologique [1].

En Algérie, pays avec plus de 3000 espèces dont 15% endémiques [4], auxquelles la population a recours à la médecine traditionnelle, on commence à entreprendre des systèmes portant sur des plantes médicinales issues de sa flore.

Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmacologique des plantes médicinales Algériennes, dans le double but de valoriser et de rationaliser leurs usages traditionnels et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel.

*Globularia alypum* L est une plante médicinale qui appartient à la famille des Globulariacées, caractéristique des régions méditerranéennes, elle est largement utilisée par la population algérienne dans la médecine traditionnelle [5].

La valeur thérapeutique de cette plante est due à ses métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques principalement les flavonoïdes, acides phénoliques, les composés terpéniques et les iridoïdes [7.8].

Notre travail consiste en l'étude phytochimique de la plante *Globularia alypum* L notamment l'extraction, purification et identification structurale de métabolites secondaires issues de l'extrait hydro-alcoolique de cette plante en basant sur les différentes techniques de séparations chromatographiques tels que la chromatographie sur colonne et couche mince analytique et préparatif.

Nous avons basé dans cette étude sur la technique spectroscopique UV-Visible pour déterminer les composés phénoliques isolés.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres principaux :

Le premier chapitre est consacré sur un rappel bibliographique sur les flavonoïdes impliquant la définition, classification et l'intérêt biologique de ces métabolites ainsi que les différentes méthodes d'analyse spectroscopique des flavonoïdes notamment la spectrophotométrie UV-Visible, la spectrométrie de Masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

## Introduction générale

---

Le deuxième chapitre port sur les travaux antérieurs effectués sur le genre *Globularia* et l'espèce *Globularia alypum* L.

Le dernier chapitre est consacré pour la partie expérimentale portée sur l'étude photochimique de l'espèce *Globularia alypum* L de point de vu extraction, séparation et purification de ses métabolites secondaires et nous avons terminé notre travail par l'identification structurale des composés isolés suivi par une conclusion générale.

### Références bibliographiques

[1]Dibong Siegfried Didier,Mpondompondo Emmanuel, Ngoye Alfred, Kwin ,Marien France ,Betti Jean Lagarde, Journal Of Applied Biosciences 37,2496-2507.

[2]**Duraffourd et al., 1997**

[3]Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of medicine, 27; 1-93.

[4]Pelt J.M (2001) Les nouveaux actifs naturels, Marabout, Paris

[5]Justen.U;Knuthsen.P; Leth. T, Journal of chromatography,(1998).

[6] I. Calis, I. Saracoglu, M. Zor, R. Alacam, Turk. J. Med □□Pharm. 1988, 12; 230

[7] C. Andary, 1993, Caffeic acid glycoside esters and pharmacology. In: A. Scalbert Ed. Polyphénolic phenomena. INRA Ed., Paris, pp. 237-255.

- Les Flavonoïdes

### I.1.Introduction

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 4 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux, les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre Citrus où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Des boissons telles que le vin rouge, le thé et le café en contiennent également des quantités importantes, ils sont réputés pour protéger contre différentes affections chroniques (maladies cardiovasculaires, cancers) et ils sont utilisés aussi dans le traitement de la crise hémorroïdaire ou des jambes lourdes [1].

Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été utilisés en médecine traditionnelle dans le monde. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavonones [2]. Ils forment une sous-classe des poly phénols. Ils ont été découverts par Albert Szent-Györgyi en 1936 qui a reçu pour cela le prix Nobel de physiologie ou médecine [3].

### I.2.Définition

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides [4].

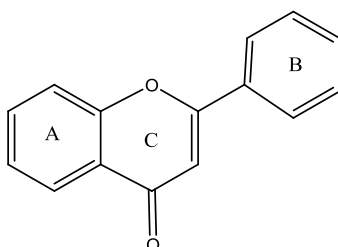


Figure I.2 : Noyauflavone

Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base [4].

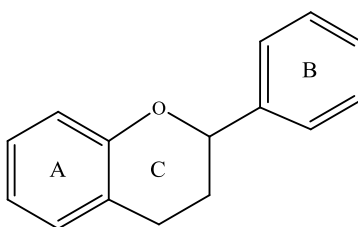
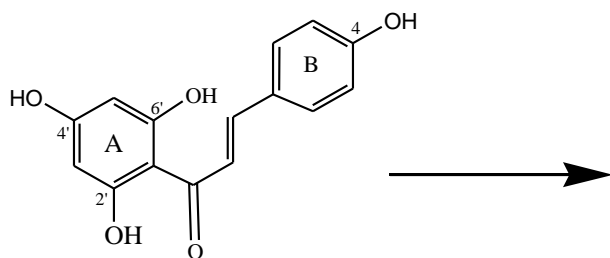


Figure I.2 : Noyauflavane

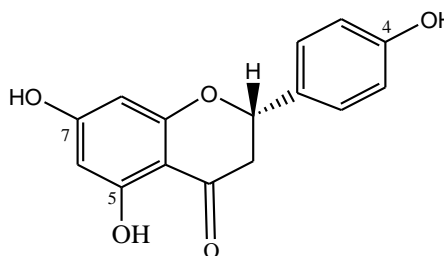
Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) [4].

### I.3. Classification des flavonoïdes

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (Figure I.1) par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (Figure I.2). Cela étant, l'un d'entre eux peut être absent.



**Figure I.3 :** 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone



**Figure I.4 :** flavanone

#### a. Flavones et flavonols

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

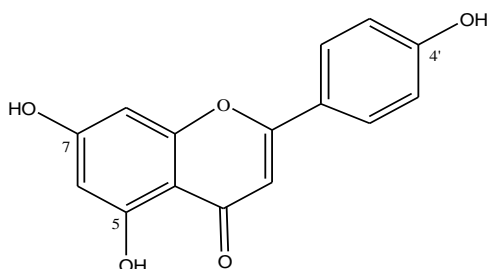


Figure I.5 : flavone

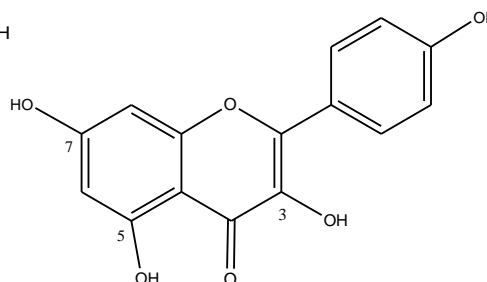


Figure I.6 : flavonol

### b. Flavonones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison entre 2 et 3 et par la présence de centres d'asymétrie.

Dans les Flavanones naturelles, le carbone C2 est normalement de configuration (2S).

Si, pour les dihydroflavonols, quatre isomères sont théoriquement possibles, la presque totalité des composés de la série connus à ce jour sont de configuration 2R ou 3R, le phényle et l'hydroxyle étant en trans [6].

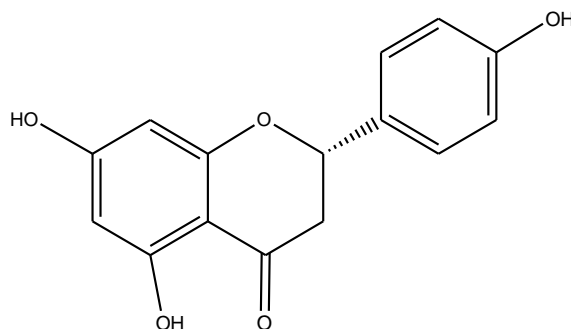
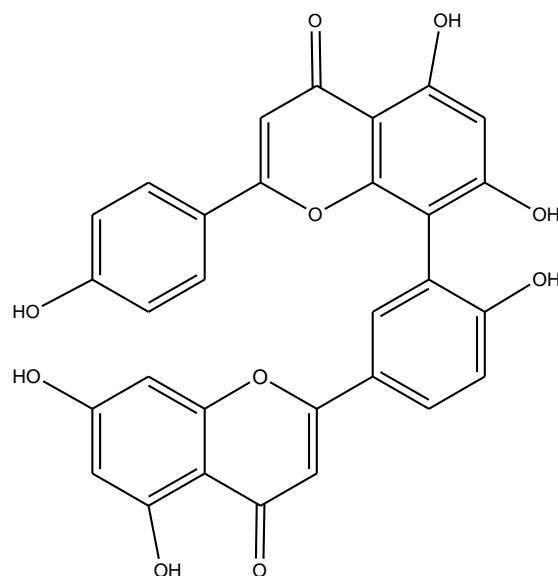


Figure I.7: Flavanone

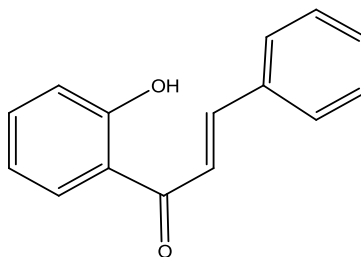
### c. Bi flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones très réactifs, C6 ou C8. La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavonones [6].

**Figure I.8** : biflavonoïdes

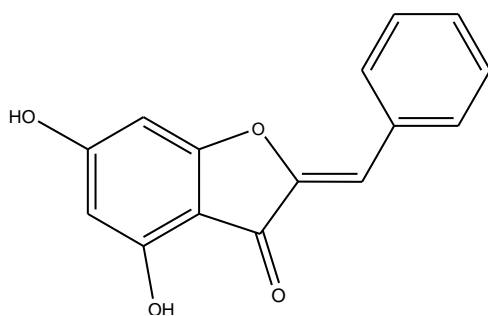
#### d. Chalcones et aurones

Les chalcones (Figure I.9) diffèrent des autres types de flavonoïdes par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique,  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué ; alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus identiques à celles autres flavonoïdes [6].

**Figure I.9** : chalcone

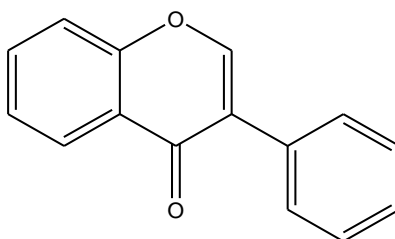
Les aurones (Figure I.10) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.



**Figure I.10** : aurone**e. Isoflavone et neoflavone**

Les isoflavonoïdes (Figure I.11) sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses [7].

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

**Figure I.11**: isoflavone

Les neoflavones (Figure I.12) sont caractérisées par la substitution entre le groupement carboxyle et le noyau B dans le squelette des flavones [8].

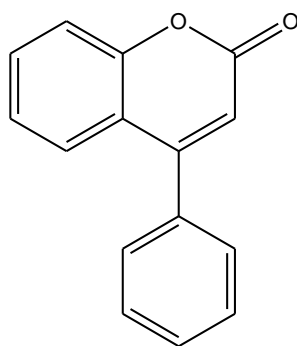


Figure I.12 : neoflavone

#### I.4. Biosynthèse des flavonoïdes

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C-6 (A et B), reliés par une chaîne en C-3 (Figure I.13) [9].

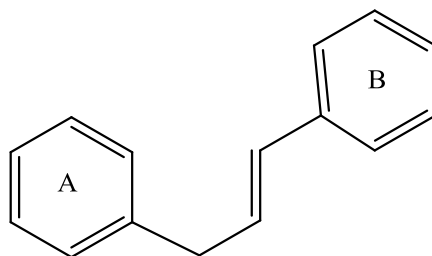
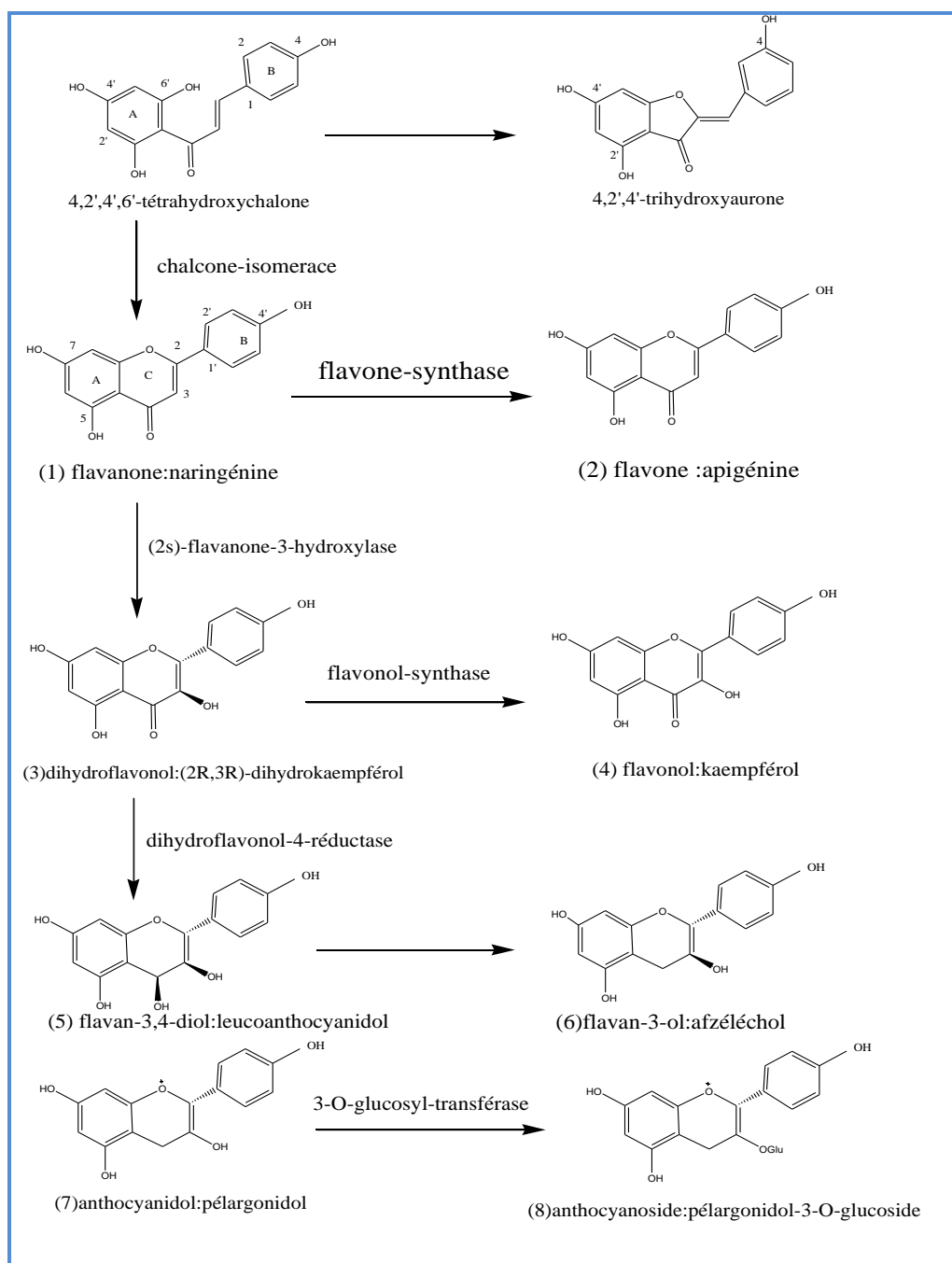


Figure I.13 : Squelette de base des flavonoïdes

Leur biosynthèse (Figure I.13) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou le dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7) (Figure 12). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside (Figure 12). Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

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

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



**Figure I.14** : la biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

**I.5. Intérêt biologique des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont depuis longtemps reconnus comme des molécules possédant un nombre remarquables d'actions biochimiques et pharmacologiques. Suggérant que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. Certaines d'entre eux (essentiellement dans des préparations à base de Rutine, et de Quercetine) sont depuis longtemps employées empiriquement dans la pathologie circulatoire en tant que veine tonique et vacuole protecteur [10].

poly phénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices et anti œdémateuses
Flavonoïdes	Anti tumorales Anti carcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires
Pro anthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antifongiques Anti-inflammatoires

**Tableau I.1 :** les activités biologiques, des composés polyphénoliques.

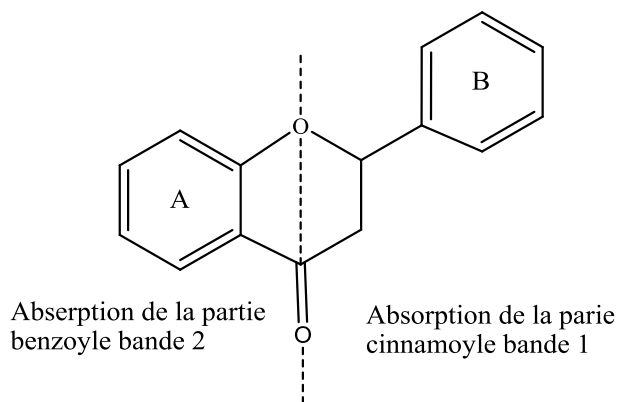
## I.6. Méthodes d'analyses structurales

### a. La spectrophotométrie UV-visible

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques, elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales, la bande 1 et la bande 2 [11].

Ces deux bandes représentent les absorptions dans le proche UV, des chromophores composant le squelette flavonique.

Ainsi la bande 1 présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C (Fig13). La bande 2 présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [12].



**Figure I.15** : la bande caractéristique d'un squelette flavonique

Tableau I.2 donne l'intervalle du maximum d'adsorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Type de composé flavonique	Bande 1	Bande 2
Flavones	320-350	250-270
Flavonols	352-385	250-280
Flavanones	300-330	245-275

**Tableau I.2 :** relation entre le maximum d'adsorption en UV et le type de flavonoïdes.

Le maximum d'adsorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'adsorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycolyses fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus courtes [13].

### ➤ Protocole

Préparation de la solution du produit purifié et des réactifs de déplacement : Une petite quantité du produit est diluée dans du MeOH jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

Les réactifs de déplacement sont préparés comme suit [14.15] :

- Solution aqueuse de soude à 0.5 N.
  - Chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>): 5 g d'AlCl<sub>3</sub>, anhydre frais est délicatement dissous dans du MeOH (100 ml).
  - Acide chlorhydrique conc. (HCl): 50 ml d'HCl 37% de concentration est diluée dans 100 ml de H<sub>2</sub>O.
  - Acétate de sodium (AcONa): anhydre en poudre.
  - Acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>): solution aqueuse à 5%.
- (NB: tous les produits utilisés sont de qualité analytique).

### ➤ Lecture des spectres

- Le spectre du flavonoïde pur dilué est mesuré (spectre "MeOH").
- Quelques gouttes de solution de NaOH 0.5 N sont ajoutées dans la cuve contenant le flavonoïde dans le méthanol et après homogénéisation, le spectre "MeONa" est enregistré. Le spectre "MeONa" est relu après 5 minutes afin de vérifier toute décomposition de la molécule phénolique.
- Dans une autre cellule contenant le flavonoïde dilué, 5 gouttes de AlCl<sub>3</sub>, sont Additionnées, l'échantillon mélangé et le spectre AlCl<sub>3</sub>; enregistré ; 3 à 5 gouttes de HCl sont ensuite ajoutées et le spectre "AlCl<sub>3</sub>/HCl" mesuré.
- Quelques grains de AcONa sont ajoutés au flavonoïde dilué jusqu'à saturation. Le spectre "AcONa" est mesuré. Enfin, le spectre "AcONa/ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>," est enregistré après addition de quelques gouttes à 5% de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et homogénéisation, le spectre est enregistré. Chaque flavonoïde

a ainsi été caractérisé par six spectres UV, donnant d'importantes informations sur la structure de la molécule.

➤ **Interprétation des spectres**

Les spectres UV enregistrés dans le MeOH permettent de déterminer à quelle classe de flavonoïdes appartient chacun des composés purifiés. Les déplacements des maxima provoqués par les différents réactifs sont interprétés en se basant sur les informations disponibles dans tableau I.3.

REACTIFS	DEPLACEMENT EN (NM)		INTERPRETATION
	Bande I	Bande II	
MeOH	310 – 350	250 – 280	Flavones
	330 – 360	250 – 280	Flavonols (3-OH substitué)
	350 – 380	250 – 280	Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+40 à 60 avec stabilité d'intensité		4' – OH
	+50 à 60 avec diminution d'intensité		3 OH et 4' OR
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4' – OR
	Apparition d'une 3eme bande entre BI et BII		7 – OH
	Absence de bande entre 320 – 335		7 – OR
	Transformation de bande I en une inflexion		5 - OH (seule hydroxylelibre)
AlCl <sub>3</sub> / MeOH	+20 à 45		5 – OH
	+60		3 – OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl/ AlCl <sub>3</sub>	-30 à -40		Ortho di OH sur le noyau B
	-20 à -25		Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur lenoyau B)
AlCl <sub>3</sub> +HCl/ MeOH	+35 à 55		5 – OH
	+17 à 20		5 – OH (avec 6-oxygénation)
	+50 à 60		3 - OH ou 3 - OH et 5 – OH
NaOAc/ MeOH	+5 à 20		7 – OH
	Déplacement très faible		7 – OR
	Diminution d'intensité avec le Temps		6 ,7; 7,8 ou 3',4' di OH
	Le spectre se décompose avec le		5, 6,7 ; 5, 7,8 ou3, 3',4'

	Temps	-tri OH
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+12 à 36	3',4' di OH
	+5 à 10	6,7 ou 7, 8 di OH

**Tableau I.3 :** Déplacement des bandes 1 et 2 dans les différents réactifs.

### b. La Spectrométrie de Masse (SM)

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituant hydroxyles ou méthoxyles [16]. Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements sur la séparation des substituant entre le noyau A et le noyau B. Cette technique connaît actuellement un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse de structures glycosylées tels que la FAB, l'électro spray utilisée comme détecteur en CLHP. En couplage avec la RMN celle-ci permet des analyses très rapides et très rigoureuses.

### c. La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Elle permet de connaître :

- le nombre de sucres liés à l'aglycone et la nature de leur liaison ( $\alpha$  ou  $\beta$ )
- la position et le nombre de substituants méthoxyles sur le squelette flavonique [17.18]. Les tableaux I.4 et I.5 contiennent quelques déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A et du noyau B.



Protos du noyau A Nature du flavonoïde	(H-5) $\underline{\delta}$ , ppm $J$ , Hz	(H-6) $\underline{\delta}$ , ppm $J$ , Hz	(H-8) $\underline{\delta}$ , ppm $J$ , Hz
5, 7 -OH	/	6,0-6,2 d 2,5	6,3-6,5 d 2,5
5-OH, 7-OR (R=Glc)	/	6,2-6,4 d 2,5	6,5-6,9 2,5
7-OR(R=H, sucre)	8,0 d 9	6,7-7,1 dd (9,0 :2,5)	6,7-7,0 d 2,5
5, 6,7-OR (R=H, Sucre) 5,7,8-OR	/	6.3 S	6.3 S

**Tableau I.4 :** Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.

Protons du noyau B nature du flavonoïde	(H-2', H-6') $\underline{\delta}$ , ppm $J$ , Hz	(H-3', H-5') $\underline{\delta}$ , ppm $J$ , Hz
Flavone (4'-OR)	7,7-7,9 d 8,5	/
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1 d 8,5	/

**Tableau I.5 :** Les déplacements chimiques et constants de couplage des protons du noyau B.

**Références bibliographiques**

- [1]Lugasi.H, Leroy.H.F.Précis de botanique, végétaux supérieurs,(1982),426.2ème Ed.
- [2]Justen.U;Knuthsen.P; Leth. T, Journal of chromatography,(1998).
- [3][www.fr.wikipedia.org/wiki/Flavonoïde](http://www.fr.wikipedia.org/wiki/Flavonoïde) .
- [4]C.Duval etR.Duval, «Dictionnaire de la chimie et de ses Applications»,(1978), Edition.Tec &Doc Lavoisier,paris.
- [5]AbdekghafourMarfak;(2003) ; Biophysique ; Thèse de Doctorat ; Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides.Univ.Limoges ;Ecole Doctorale sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie.
- [6]Bruneton.J, (1993), Pharmacognosie et phytochimie. Plantesmédicinales. Paris, France :Eds Lavoisier.
- [7]Bruneton.J.B, (2001), Twenty-five years of chimicalecology,Nat Prod Rep,18,361-379.
- [8]Eyton. W.B, Ollisw.D, Sutherland I.O,Gottlieb.O.R, Traviramaglhaes.M. Proc. Tetrahedron, (1965) 21,2683.
- [9]Bruneton.J.*Pharmacognosie, Phytochimie*(1999), *Plantes médicinales*, (3ème Éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, , 1120p.
- [10]Bronner.W.E, Beecher.G.R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*. 1995, 705:247-256.
- [11]jurd,L.andHorowitz,R.(1962),spectral properties of flavonoïdecompounds,pergamon press,Oxford,107-2055
- [12]Markham,K.R.,THECHNIQUES Of flavonoids identification, eds academic press (1982).
- [13] jurd,.and Horowitz,R.(1962),spectral properties of flavonoïdecompounds,pergamon press,Oxford,107-2055
- [14] T.J. Mabry, Markham, K.R., and Thomas, M.B. The Systématique Identification of Flavonoïdes, 1970, p. 1 2 ET 35-230. Springs-Verlag, New York. Heidelberg. Berlin.

[15]K.R. Markham, (1982).Techniques of Flavonoïde identification. London:Académie Pressa.

[16]Nielsen, J.G. et Moller, J. Acta. Cham. Scand, 1 970, 24, 2665.\*

[17]G.vernin,la chromatographie en couche mine, Techniques et application en chimie organique, 1970, Dunod,paris.

[18]A.Ismaili ;M.Jay, Phytochemistry,1989,28(11),p.3035-3037.

## II.1.Introduction

*Globularia alypum* est une plante vivace, communément appelée Tasselgha ou ain larneb au Maghreb, c'est une plante très abondante dans le pourtour du bassin méditerranéen, surtout à son ouest où elle forme d'importants buissons très ramifiés, principalement dans les lieux rocaillieux, broussailleux et secs.

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustives très rameuses, d'environ 30-60 cm d'hauteur. Les tiges sont dressées, brun-rouge striées, à petites feuilles persistantes très nombreuses, alternes, coriaces et glabres, de forme ovale ou oblongue, atténuées en court pétiole et disposées le long et au sommet. Les fleurs sont en général bleues-violacées, à quatre étamines, groupées en capitules hémisphériques plus ou moins globuleux, entourés d'un involucre de bractées atteignant près de 2 cm de diamètre. Elles ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée. [1]



Figure II.1: *Globularia alypum* L.

## II.2.Description botanique et répartition géographique

La plante *Globularia alypum*, autrement appelée Globulaire, est une plante classique appartenant à la famille des Globulariées. Cette famille comprend deux genres dont *Globularia* et *Poskea* et d'environ trente espèces répartis en Europe et en Afrique du nord. Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec *alypon* qui signifie calmer la douleur [2].

*Globularia alypum* est communément appelée « Tasselgha », « Chebra », « Chelr'a », « Zerga », « Zeriga », « Zouitna », « Alk », « Haselra », « Oulbarda ». Au Maroc elle est appelée Ein larneb. Les espèces de *Globularia*, sont des arbustes ayant des rameaux d'environ de 60 cm de hauteur (30-60cm), à feuilles alternes, dont les fleurs groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées. La description de *Globularia alypum* est résumée dans le

tableau

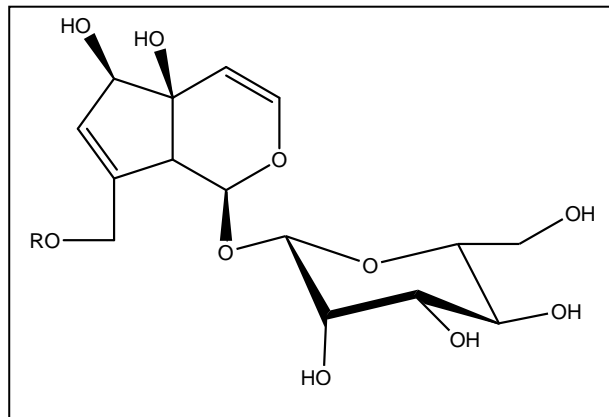
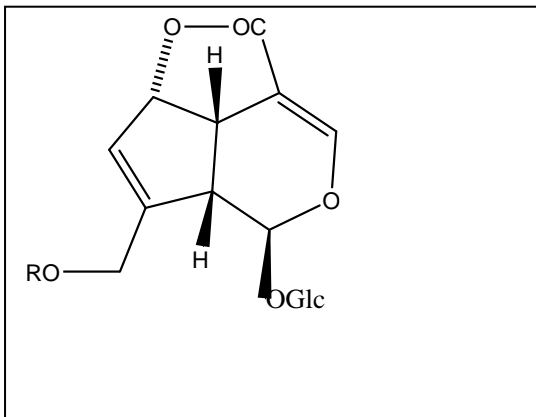
suivant:

<b>Répartition</b>	<b>Toutes les régions méditerranées</b>
Ecologie	Lieux sec et arides
Fleurs	Un beau bleu, odorantes, en tête subsessile, terminales et latérales, larges de 15-20 mm
Taille globule Max	60cm
Taille globule Min	30cm
Forme générale	Érigée
Type biologique	Chaméphyte
Disposition feuille sur tige	Alterné

**Tableau II.1:** Description de *Globularia alypum*.**II.3. Classification botanique**La classification de *Globularia alypum* est décrite par **Bock (2013)**.**Règne :** Végétal.**Ebranchement :** Angiospermes.**Classe :** Dicotylédone.**Sous Classe :** Astérides.**Ordre :** Lamiales.**Famille :** Globulariacées.**Genre :** *Globularia*.**Espèce :** *Globularia alypum* L.**Figure II.2 :** Aspect morphologique de *Globularia alypum* L.

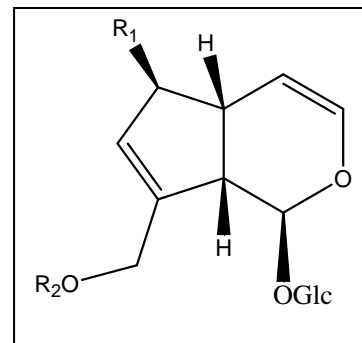
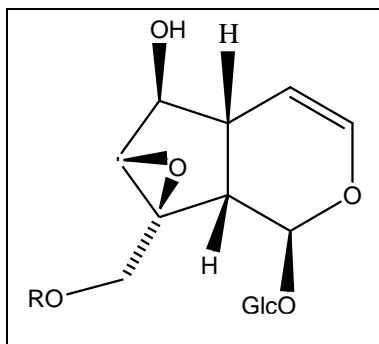
## II.4. Etude chimique antérieures sur le genre

La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés de genre *Globularia*. Ce sont essentiellement des flavonoïdes et des phénylétanoïdes. Ces composés sont des glycosides du phénylétanoïde estérifié par l'acide cinnamique (ex. acide caféique, férulique, p-coumarique). Ils ont un effet inhibiteur sur les enzymes 5-lipase oxygénase, aldose réductase et sur les protéines kinase [3, 4]. La littérature signale également leurs effets immunosuppresseurs [5], anti-inflammatoire et anti-microbien [6, 7]. Les iridoïdes glycosides constituent également des métabolites secondaires du genre *Globularia*. Ils comprennent un cyclopentane et des cycles pyraniques. Ces structures sont connues pour leurs diverses activités biologiques [8, 9]. Une étude phytochimique réalisée sur l'extrait de l'espèce *Globularia cordifolia* en 1970 par Kinzel H. et collaborateurs [10] a permis d'isoler et d'identifier un composé de type iridoïde, l'asperuloside (1).



$\underline{1}R = Ac$   $\underline{2}R = benzoyl$

Une autre étude effectuée sur les parties aériennes de la même espèce [11] a révélé la présence d'un nouvel iridoïde glycosylé et acylé, appelé globularifolin (2) et cinq autres composés connus, l'asperuloside (1), l'aucubine (3), le melampyroside (4), le monomelittoside (5) et le catalpol (6).



$\underline{6}R = H$

	$R_1$	$R_1$
3	OH	H
4	OH	Benzoyl
5	OH	Ac

### II.5. Etude chimique antérieure

*Globularia alypum* Lest chimiquement riche en composés phénoliques, les études réalisées sur cette plante sont résumées dans le tableau II.

Chercheurs(année)	parties étudiées	les produits isolés de la plante	références
Sanchez (1933) Espagne	/	- acide cinnamique -acide pyrocatechique	[12]
Bernard, P. (1974) France	Feuilles	-globularine -acide cinnamique -catalpol -acide caffeique -rutine -acide ferulique -luteoline -7-glucoside -acide p-coumarique -acide chlorogenique	[13]
Chaudhuri R.K.(1979 et 1981) Suisse	plante entière	-globularimine -globularine -globularinine -catalpol -globularidine -liriodendrine -globularicisine -syringine	[14.15]
Benhassine B.(1982) Tunisie	plante entière	- 4',7-dihydroxyflavone - apigénine-7-gucoside - quercetol luteoline-7-glucoside 8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone rutoside cyanidine peonidine acide vanillique acide syringique acide caffeique acide sinapique acide p-coumarique acide ferulique acide b-resorcylique	[16.17]
Louis S.(1999) France	feuilles	globularine	[18]

**Tableau II.2:** études antérieures sur l'espèce *Globularia alypum*.

## Référence Bibliographique

- [1] N. T. Beniston and W. S. Beniston, 1984, Fleurs d'Algérie, E. N. L. Alger.
- [2] P. Quezel., S. Santa., 1963, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, tome II .CNRS, Paris. P.860.
- [3] I. Calis, I. Saracoglu, M. Zor, R. Alacam, Turk. J. Med & Pharm., 1988, 12; 230
- [4] C. Andary, 1993, Caffeic acid glycoside esters and pharmacology. In: A. Scalbert Ed. Polyphénolic phenomena. INRA Ed., Paris, pp. 237-255.
- [5] H. Sasaki, H. Nishimura, T. Morata, M. Chin, H. Mitshuhashi. Y. Komatsu, H. Maruyama, T. Guo-rui, H. Wei, X. Yu-Long, Planta Med., 1989, 55, 458.
- [6] U. B. Ismailoglu, I. Saracoglu, U. S. Harput, I. Sahin-Erdeli, J. Ethnopharmacol., 2002, 79. 193
- [7] P. Sarkhail, M. Abdollahi, A. Shafiee, Pharmacol. Res., 2003, 48, 263.
- [8] O. Sticher, 1977, Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity. In : Wagner, H. & Wolff, P. Ed. New Natural Products and plant drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity. Springer-Verlag, New York, Berlin,.
- [9] J. Holzel, 1997, The genus Valerian. In : P. J. Houghton, Ed. Valerian, Harwood Academic Publishing, Amsterdam.
- [10] H. Kenzel, H. Stummerer-Schmid, 1970, Phytochemistry, 9(10), 2237-9
- [11] R. K. Chaudhuri, O. Sticher, 1980, Helvetica Chimica Acta, 63(1), 117-20.
- [12] J. V. Sanchez. Anales soc, 1933, Espan. Fis quim. 31, 361-3.
- [13] P. Bernard, M. M. Lallemand, G. Blansard ,1974, Plantes Médicinales et Phytothérapie, 8(3), 174-9.
- [14] R. K. Chaudhuri, O. Sticher, T. Winkler, 1979, Helvetica Chemica Acta, (34), 3149-52.
- [15] R. K. Chaudhuri, O. Sticker, 1981, Helvetica Chemica Acta, 64(1), 3-15.
- [16] B. Ben hassine, A. Bui, Z. Mighri ,1982, Journal de la Société Chimique de Tunisie, 7, 3-10.
- [17] B. Ben hassine, A. Bui, Z. Mighri, A. Cave, 1982, Plantes Médicinales et Phytothérapie, 16(3), 197-205.
- [18] S. Louis, F. Darghouth-Kesraoui, B. Baghdikian, R. Elias, K. Boukef, G. Blansard. Pharmazie, 1999, 54(4), 309-310.



### III.1.Introduction

La Globularia buissonnante (*Globularia alypum* L) parfois appelée turbith est une plante qui appartient au genre *Globularia* et à la famille des Globularia ces. Caractéristique des régions méditerranéennes elle forme dans la garrigue d'importants buissons aux fleurs bleues de 30-60 cm de hautes aux fleurs bleues très ramifiées.

### III.2. dénomination

Globulaire.

Turbith.

Séné de Provence.

Herbe terrible.

Globulaire purgative.

### III.3. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude a été récolté dans la région de BirEchouhada, commune de la wilaya d'Oum El-Bouaghi en Algérie, située sur la route N°W48, à 63 km à l'ouest de la Wilaya en mois de Mai de l'année 2018.



**Figure III. 1 :** Localisation de la wilaya d'Oum El-Bouaghi en Algérie.



**Figure III. 2 :** Localisation de la commune de BirChouhada dans la wilaya d'Oum El-Bouaghi.

#### **III.4. Préparation du matériel végétal**

Le matériel végétal se compose de feuilles et fleurs de la plante *Globularia alypum* L, ses parties aériennes sont laissées à l'ombre pour sécher à température ambiante dans un endroit ventilé pendant une semaine.



**Figure III.3 :** la plante *Globularia alypum* L.

La matière végétale séchée est coupées à l'aide de ciseaux, la matière broyée obtenue est stockés à température ambiante, dans un endroit sec et protégée contre l'humidité et la lumière.

#### **III.5. Extraction de la plante**

L'extraction de la plante a été réalisée en deux étapes:

Extraction à partir du matériel végétal (extraction solide - liquide) puis fractionnement de l'extrait obtenu (extraction liquide- liquide).

### III .5.1. Extraction solide/liquide

La macération consiste à mettre une plante ou une partie de la plante, dans le méthanol aqueux pour extraire les principes actifs (macération aqueuse) pendant plusieurs heures [1, 2].

156,3 g de la matière végétale (parties aériennes ; fleurs et feuilles) de la plante a été mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol /Eau) dans la proportion (80/20 ; v/v) pendant 48 h à température ambiante puis filtrer sur un papier filtre, cette opération a été répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Après évaporation du solvant à température n'excédant pas 35°C par un évaporateur rotatif ou Rotavape (**figure 2**), l'extrait brut obtenu a été mis à une autre extraction type liquide / liquide par des solvants différents.

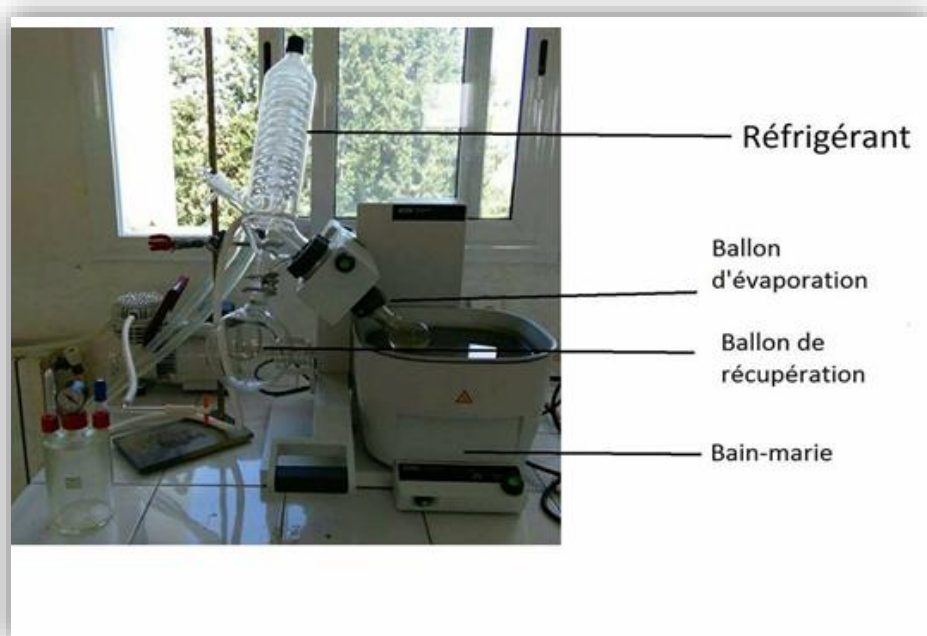


Figure III.4: Evaporateur rotatif.

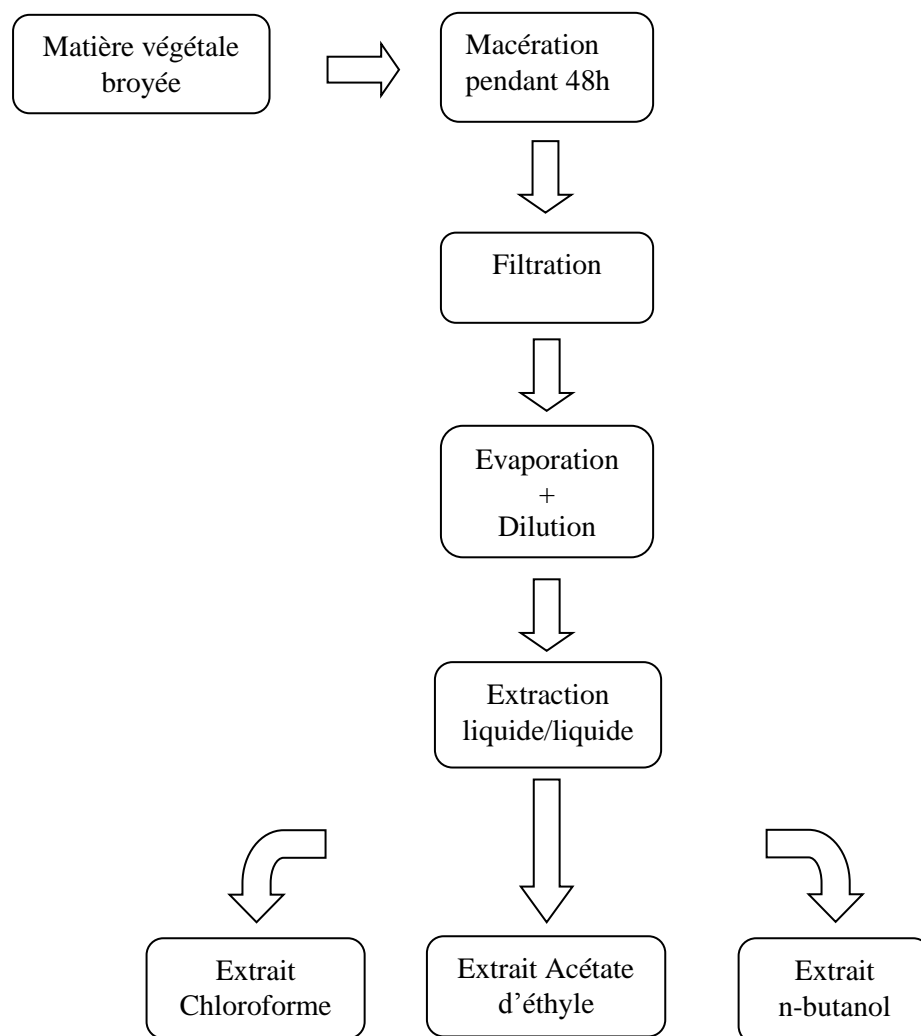
### III.5.2. Extraction liquide/liquide

L'extrait hydro-alcoolique obtenu est dilué dans une petite quantité d'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, puis a subi des extractions successives dans une ampoule à décanter de 500 ml, en commençant par le solvant le moins polaire qui est le trichlorométhane puis on augmente la polarité en utilisant l'acétate d'éthyle et le n-butanol, l'opération est répétée deux fois pour chaque solvant et la quantité du solvant utilisée est toujours le 1 /3 du volume de phase aqueuse utilisée. Les solutions préparées (phase aqueuse et phase organique) ont été bien mélangées et laissées reposer aux moins 20 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases bien séparées.

Les trois phases organiques obtenues (Chloroforme, Acétate d'éthyle et n-butanol) sont traitées par une petite quantité du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pour éliminer les traces d'eau puis filtrés, évaporés à secs et pesés, les masses de trois extraits sont :

- Masse de l'extrait chloroformique = 0.85 g.
- Masse de l'extrait acétate d'éthyle = 0.69 g.
- Masse de l'extrait n-butanol = 1.12 g.

Le processus d'extraction est résumé dans la figure suivante :



**Figure III.5:** Protocole de préparation de différents extraits de la partie *Globularia alypum* L.

Notre étude a été basée sur l'extrait chloroformique à cause de sa richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes, en effet cet extrait a été soumis à des tests chromatographiques sur couche mince afin d'avoir une idée sur le bon système à utiliser pour la séparation sur colonne.

### III.6. Séparations chromatographiques

Les méthodes de séparation chromatographiques utilisées durant la réalisation de ce travail sont :

### III.6.1. Séparation chromatographique sur colonne

L'extrait chloroformique (0,85 g) a été dissout dans le minimum du méthanol dans un ballon de retavapor, la solution obtenue est mélangée avec une petite quantité de gel de silice pour colonne puis évaporée jusqu'à l'obtention d'un solide, ce dernier a été bien gratté et récupérer sous forme d'un poudre, la masse obtenue est déposée sur une colonne de gel de silice (Type 60, 70-230 mesh, 63-200  $\mu\text{m}$ , Fluka) préparée dans l'hexane.

L'élution a été débuté par l'hexane pur puis la polarité sera augmentée par l'addition d'acétate d'éthyles enfin on termine par le méthanol pur selon le tableau suivant.

<b>Héxane (%)</b>	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
<b>Acétate d'éthyle (%)</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<b>Volume Totale (ml)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

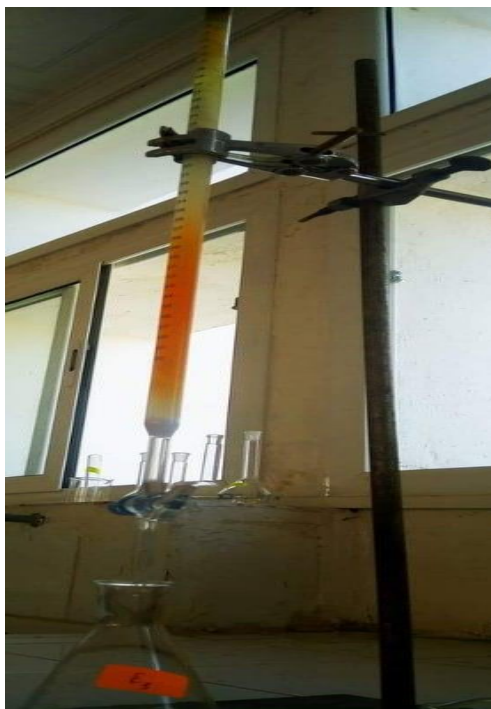
<b>Méthanol (%)</b>	100
<b>Héxane (%)</b>	0
<b>Acétate d'éthyle (%)</b>	0
<b>Volum total (ml)</b>	100

**Tableau III.1:** Résultats des fractions récoltées de la colonne de l'extrait chloroformique *Globularia L.*

Des fractions de 100 ml sont recueillies et évaporées par le rota vapeur. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau suivant :





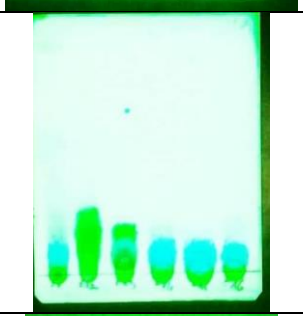
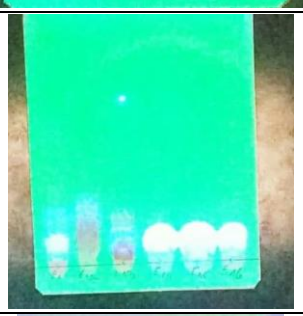
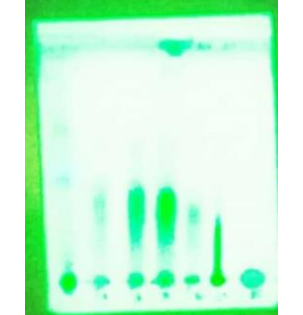

N° de la fraction	Le Volume (ml)	Système d'élution		
		Héxène%	Acétat d'éthyle%	Méthanol %
1	100	100	0	/
2	100	100	0	/
3	2.09	99	1	/
4	5.8	97.5	2.5	/
5	26	97	3	/
6	12	96	4	/
7	56	95.5	4.5	/
8	20.5	95	5	/
9	26.5	93	7	/
10	11	90	10	/
11	34	85	15	/
12	25.5	70	30	/
13	50	65	35	/
14	36	60	40	/
15	50	50	50	/
16	50	40	60	/
17	11	30	70	/
18	50	30	70	/
19	50	20	80	/
20 (méthanol)	50	0	80	20
21 (méthanol)	50	0	50	50
22 (méthanol)	50	0	0	100

**Tableau III.2** : les masses des différentes fractions obtenues.



**Figure III.6:** Chromatographie sur colonne.

Afin de regrouper les fractions similaires, les différentes fractions sont soumises à la chromatographie sur couche mince (C.C.M) en utilisant le système SI : hexane/ acétate (9 :1). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 312 nm) et révélées avec l'acide sulfurique ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ : 80 /16/4) et chauffées à  $120^\circ\text{C}$ , pendant quelques minutes, Le tableau ci-dessous montre l'ensemble des chromatogrammes de ces fractions

Les fonctions	Lampe 254 nm	Lampe 312 nm
F (1+2+3+4+5+6)		
F (7+8+9+10+11)		
F (12+13+14+15+16)		
F (17+18+19+20+21+22)		

**Tableau III.3 :** Chromatogrammes des fractions de la colonne.

Les pots de même composition sont rassemblés, donnant ainsi 9 fractions.

Les résultats de cette colonne sont rassemblés dans le tableau suivant :

Fraction	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Pots de même composition	2	3+4	5+6	7+8+9+10+11	12	13	14+15+16	17+18+19+20	21+22

**Tableau III.4 :** Regroupement des fractions issues de la colonne.



### III. 6.2. Séparation chromatographique sur couche mince

Des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice CCM (Type 60F<sub>254</sub>, support aluminium, Merck) ont été réalisés sur les deux extraits afin de choisir le meilleur système d'éluant utilisé pour la séparation sur colonne.

L'éluant est formé d'un mélange de solvant, le tableau suivant montre quelques systèmes de solvant utilisés.

Eluant	Pourcentage
• Héxane/ MeOH	(9 :1)
• Hexane/ AcOEt	(1 :1)
• Héxane/ AcOEt	(5 :1)
• hékane / Acétate	(5 :1)

**Tableau III.5:** systèmes de solvants utilisés pour la CCM.

D'après l'apparition des taches des fractions de **A** jusqu'à **I** sous les deux lampes UV (254 et 312 nm), (figures en-dessus), nous nous sommes intéressés aux fractions **B** et **G** à cause d'une part de sa richesse en produits phénoliques et d'autre part sa masse considérable et le profil des taches séparées.

### III. 7. Détermination structurale des produits isolés

#### III.7.1. Etude de la fraction B

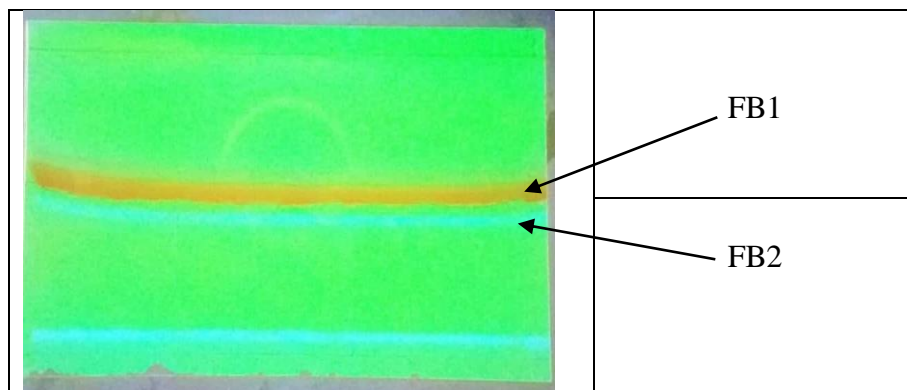
Les tests préliminaires effectués sur cette fraction ont montré que le système :

S: Hexane/Acétate d'éthyle (4 :1) est le bon système de séparation.

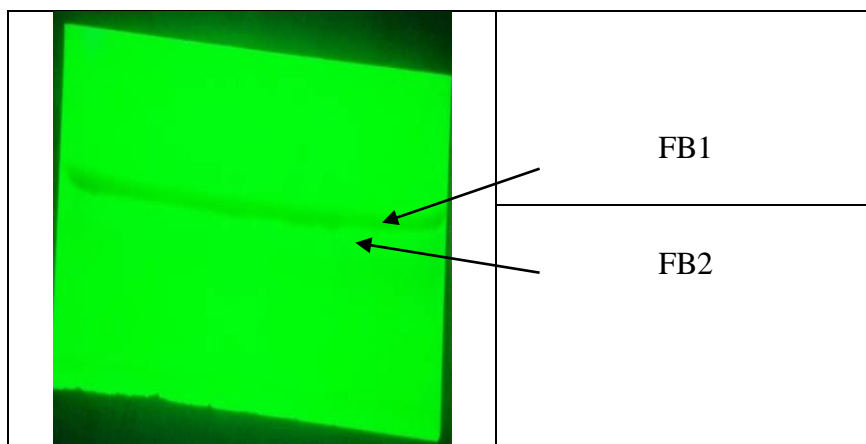
#### ➤ Mode opératoire

On dépose le produit de cette fraction le long de deux plaques analytiques (20x20) à l'aide d'un capillaire, on laisse ces deux plaques pour bien sécher avant de les plonger dans une cuve contenant un système de solvants (Hexane/acétate d'éthyle : 40 /10).

Après développement des chromatogrammes, les produits sont visualisés sous lumière UV à 254 et 312 nm et nous a permis de choisir 2 bandes en se basant sur leurs apparitions sous les deux lampes, la densité et la nature de couleur de chaque bande.



**Tableau III.6 :**Plaque sous lampe UV,  $\lambda= 312$  nm.



**Tableau III.7:** Plaque sous lampe UV,  $\lambda= 254$  nm.

Ensuite les bandes sont tracées et grattées puis dissolvent dans le solvant d'élution et le méthanol puis filtrer sous verre fritté

Des fractions sont recueillies et évaporées puis pesées.

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau suivant :

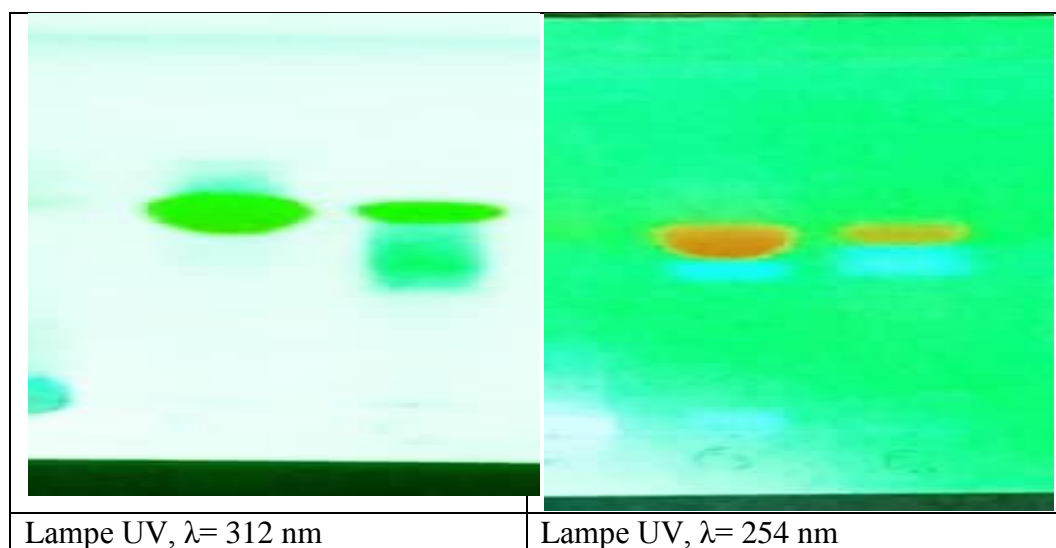
Fraction	FB
Masse vide (mg)	118.3
Masse avec produit (mg)	118.5
Masse produit pur (mg)	0.2

➤ **Conditions opératoires**

Support Chromatographique: Plaque en verre de Gel de silice 60, 20 X 20 cm, épaisseur de la couche 0,5 mm.

Les composés (bandes) isolés : **FB1** et **FB2** sont analysés par chromatographie sur couche mince (C.C.M) et visualisés sous les deux lampes (254 et 312 nm).

Les chromatogrammes de ces composés sont présentés dans le tableau suivant :



**Tableau III.8:** Chromatogrammes des produits isolés.

### III.7.2. Identification structurale du composé FB1

La fluorescence orange sous la lumière de Wood est caractéristique d'un flavonoïde type **isoflavone**.

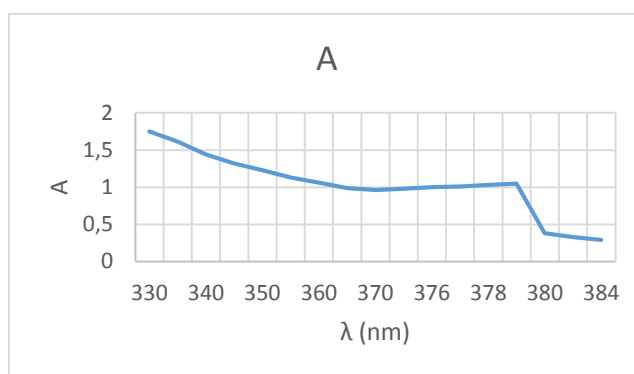
Les résultats obtenus lors d'analyse de ce composé dans l'appareil de l'UV-visible dans différents solvants sont montrés dans les tableaux qui se suivent.

L'examen du spectre UV-visible de ce composé (Spectre 1) enregistré dans le MeOH montre la présence d'une bande d'absorption 310 et 330 nm caractéristique d'un **isoflavone**.

- MeOH

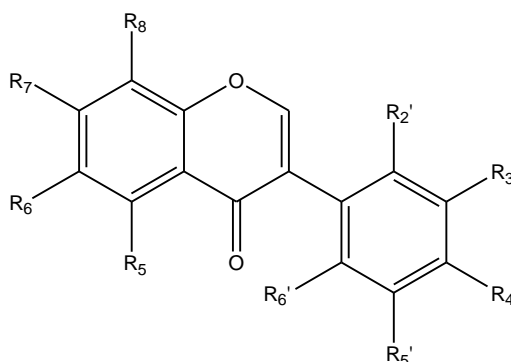
λ (nm)	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	376	377	378	379	382	384
A	1.75	1.61	1.44	1.32	1.23	1.13	1.06	0.99	0.96	0.98	1	1.01	1.03	1.05	0.33	0.29

**Tableau III.9:** Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le MeOH.



**Spectre 1 :** Spectre UV-visible du composé FB1 enregistré dans le (MeOH).

La structure partielle préliminaire de ce produit est élucidée dans la figure suivante :



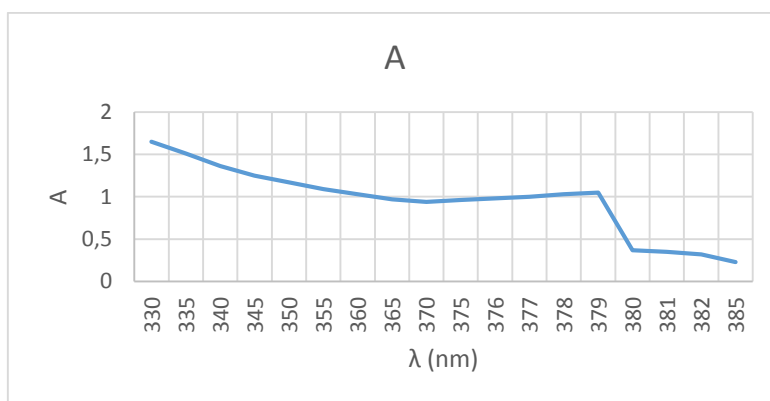
**Figure III.7 :** Structure partielle du composé FB2

- MeOH +H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

λ (nm)	330	340	345	350	355	360	365	370
A	1.51	1.36	1.25	1.17	1.09	1.03	0.97	0.94

375	376	377	378	379	380	381	382	385
0.96	0.98	1.00	1.03	1.05	0.37	0.35	0.32	0.26

**Tableau III.10 :** Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le (MeOH+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).



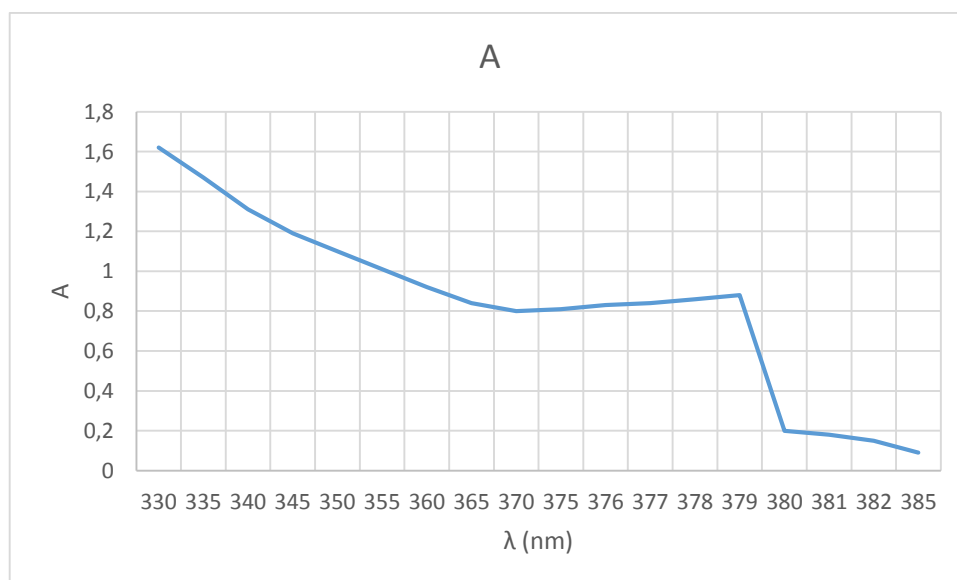
**Spectre 2:** Spectre UV-visible du composé FB1 enregistré dans le (MeOH+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

- MeOH+ AlCl<sub>3</sub>

λ (nm)	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	376	377
A	1.62	1.47	1.31	1.19	1.10	1.01	0.92	0.84	0.80	0.81	0.83	0.84

378	379	380	381	382	385
0.86	0.88	0.20	0.18	0.15	0.09

**Tableau III.11 :** Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le MeOH+ AlCl<sub>3</sub>.



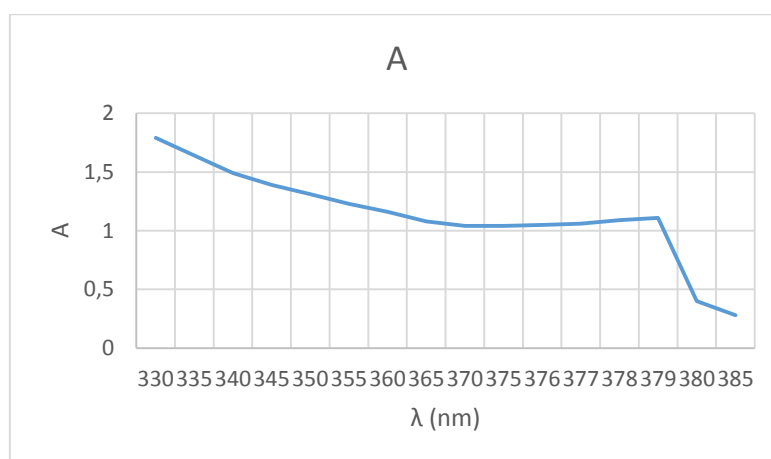
**Spectre 3:** Spectre UV-visible du composé FB1 enregistré dans le (MeOH+AlCl<sub>3</sub>).

- $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$

$\lambda$	330	335	340	345	350	355	360	370	365	370	375	376
A	1.79	1.64	1.49	1.39	1.31	1.23	1.16	1.94	1.08	1.04	1.04	1.05

377	378	379	380	385
1.06	1.09	1.11	0.40	0.28

**Tableau III.12:** Résultats de l'UV-visible du composé FB1 enregistré dans le  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ .



**Spectre 4 :** Spectre UV-visible du composé FB1 enregistré dans le ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ).

On constate que le spectre n'est pas changé c'est-à-dire reste fixe dans tous les réactifs utilisés, dans ce cas il est nécessaire d'appeler d'autres méthodes physicochimiques comme la RMN mono et bidimensionnelle pour élucider la structure complète de ce composé.

### III.7.3. Etude de la fraction G

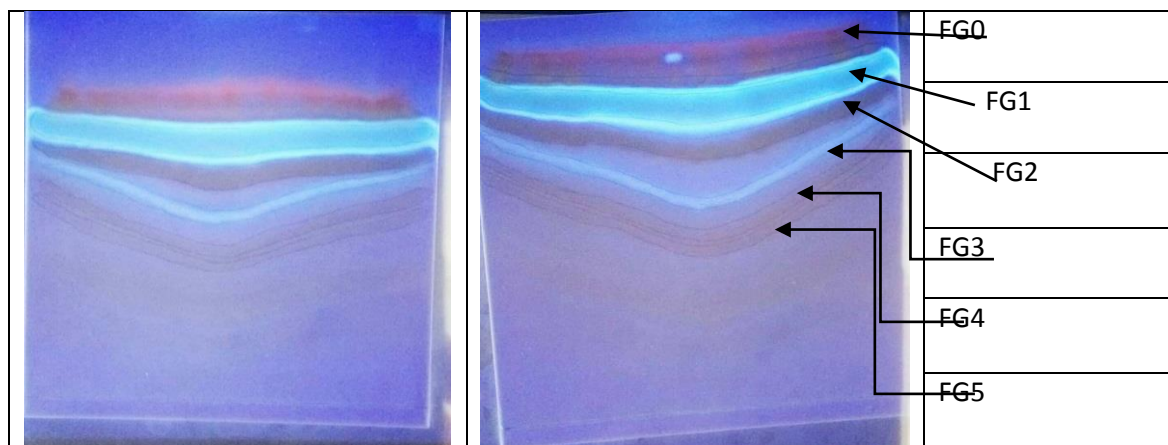
Les tests préliminaires effectués sur cette fraction ont montré que le système :

S:Hexane/Acétate d'éthyle (4 :1) est le bon système de séparation et montrant ainsi plusieurs taches.

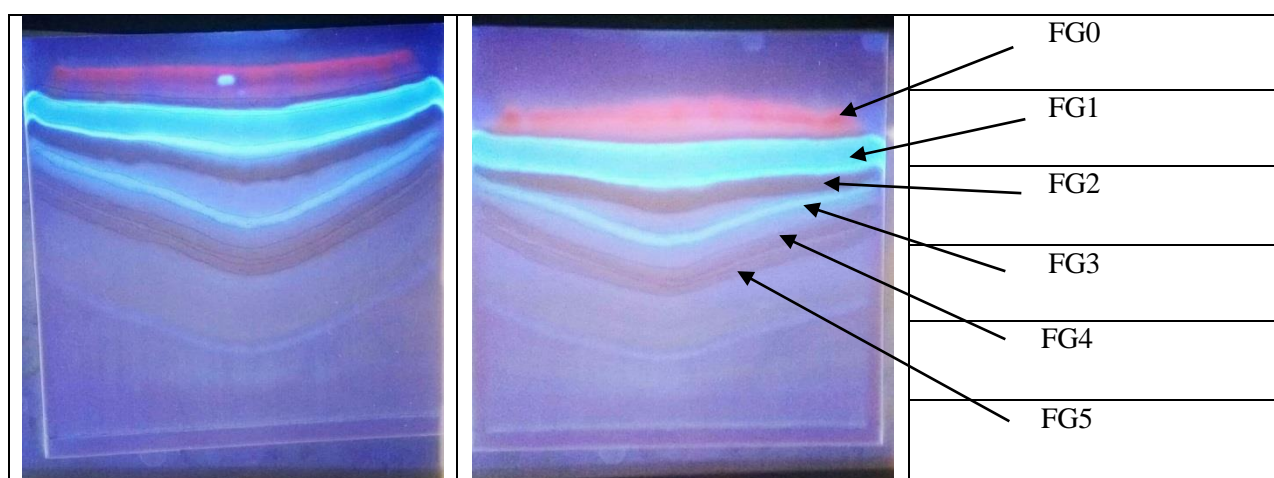
#### ➤ Mode opératoire

On dépose le produit de cette fraction le long de deux plaques de verre (20x20) à l'aide d'un capillaire, on laisse ces deux plaques pour bien sécher avant de les plonger dans une cuve contenant un système de solvants (Hexane/acétate d'éthyle: 40 /10).

Après développement des chromatogrammes, les produits sont visualisés sous lumière UV à 254 et 312 nm et nous a permis de choisir 6 bandes en se basant sur leurs apparitions sous les deux lampes, la densité et la nature de couleur de chaque bande.



**Tableau III.13:** Plaque sous lampe UV,  $\lambda = 254$  nm.



**Tableau III.14:** Plaque sous lampe UV,  $\lambda = 312$  nm.

Ensuite les bandes sont tracées et grattées puis dissolvent dans le solvant d'éluion et le méthanol puis filtrer sous verre fritté.

Des fractions sont recueillies et évaporées puis pesées.

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau suivant :



Fraction	FG0	FG1	FG2	FG3	FG4	FG5
Masse vide (mg)	13.2486	10.3781	10.3534	13.2486	13.2486	10.1147
Masse avec produit (mg)	13.8134	10.3913	10.4144	13.2723	13.2346	10.1260
Masse produit pur (mg)	0.5648	0.0132	0.061	0.0237	0.014	0.0113

➤ **Conditions opératoires**

Support Chromatographique: Plaque en verre de Gel de silice 60, 20 X 20 cm, épaisseur de la couche 0,5 mm.

Les composés (bandes) isolés : **FG0, FG1, FG2, FG3, FG4** et **FB5** sont analysés par chromatographie sur couche mince (C.C.M) et visualisés sous les deux lampes (254 et 312 nm).

Les chromatogrammes de ces composés sont présentés dans le tableau suivant :

	
Lampe UV, $\lambda = 312$ nm	Lampe UV, $\lambda = 254$ nm

**Tableau III.15:** Chromatogrammes des produits isolés.

### III .7.4. Identification structurale du composé FG2

La fluorescence Noireviolette sous la lumière de Wood est caractéristique d'un **flavone**, flavanone ou flavonol.

Les résultats obtenus lors d'analyse de ce composé dans l'appareil de l'UV-visible dans différents solvants sont montrés dans les tableaux qui se suivent.

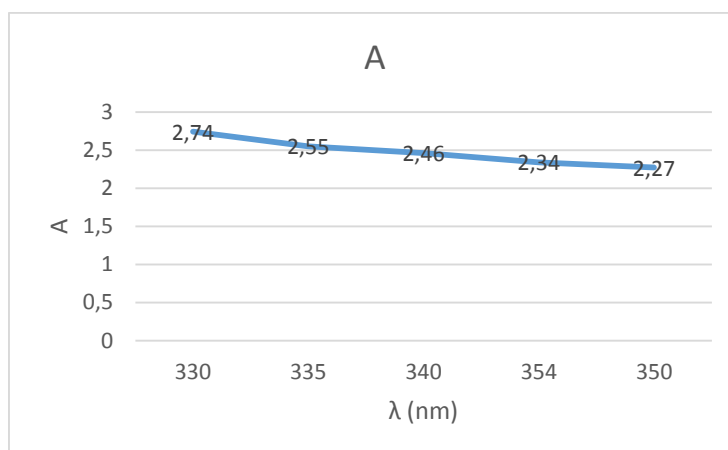
L'examen du spectre UV-visible de ce composé (Spectre 1) enregistré dans le MeOH montre la présence d'une bande d'absorption située à 330 nm caractéristique des flavonoïdes, indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type **flavone**.

- MeOH

$\lambda$	330	335	340	345	350
A	2.74	2.55	2.46	2.34	2.27

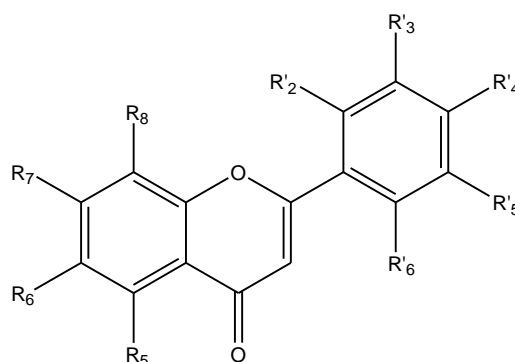
**Tableau III.16 :** Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregistré dans le MeOH.





**Spectre5:** Spectre UV-visible du composé FG2.

La structure partielle préliminaire de ce produit est élucidée dans la figure suivante :



**FigureIII.8:** Structure partielle du composé FG2.

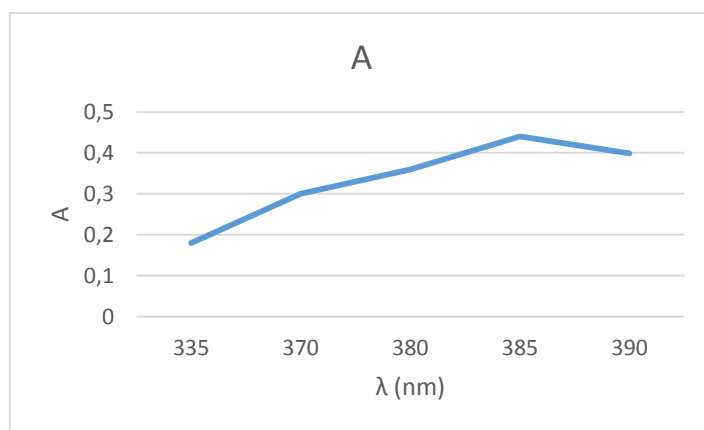
L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande ( $\Delta\lambda = + 55 \text{ nm}$ ) indique la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à 370 nm avant la bande à 385 nm indique la présence d'un OH libre en position 7.

- MeOH+ NaOH

λ	330	335	370	380	385	390
A	2.74	0.180	0.300	0.36	0.44	0.399

**TableauIII.17:** Résultats de l'UV-visible du composéFG2 enregistré dans le MeOH+NaOH.

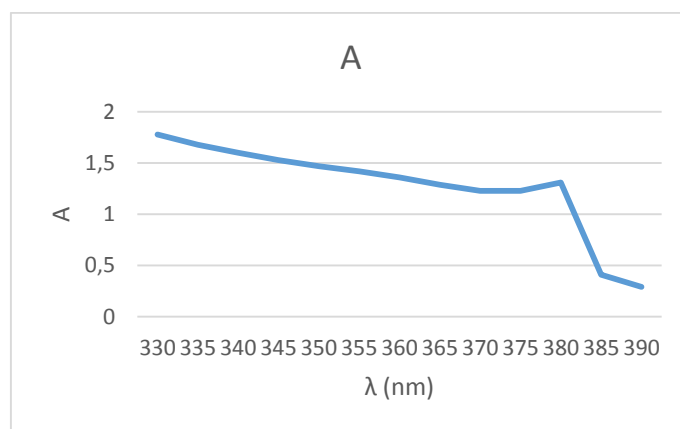


**Spectre 6** : Spectre UV-visible du composé FG2 enregisté dans le (MeOH+NaOH).

- MeOH+AlCl<sub>3</sub>

λ	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390
A	1.79	1.68	1.60	1.53	1.47	1.42	1.36	1.29	1.23	1.23	1.31	0.41	0.29

**Tableau III.18** : Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregisté dans le MeOH+AlCl<sub>3</sub>.

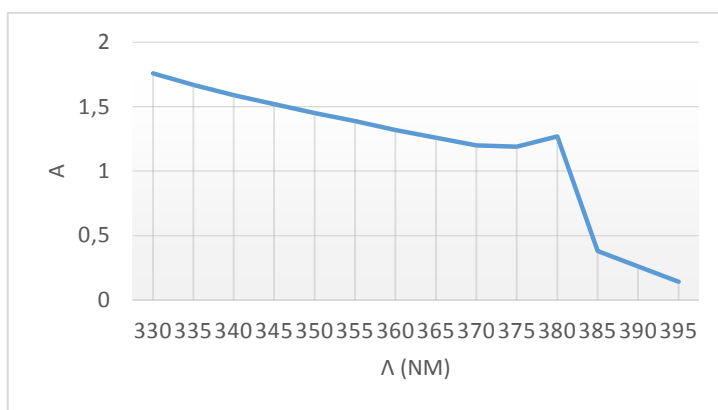


**Spectre 7** : Spectre UV-visible du composé FG2 enregisté dans le (MeOH+AlCl<sub>3</sub>).

- AlCl<sub>3</sub>+HCl

λ	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390
A	1.76	1.67	1.59	1.52	1.45	1.39	1.32	1.26	1.2	1.19	1.27	0.38	0.26

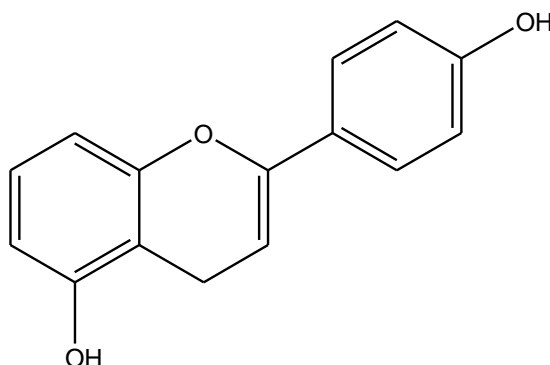
**Tableau III.19** : Résultats de l'UV-visible du composé FG2 enregisté dans le AlCl<sub>3</sub>+HCl.



**Spectre 8:** Spectre UV-visible du composé FG2 enregistré dans le (MeOH+HCl).

Le déplacement bathochrome de la bande enregistrée dans le milieu ( $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ( $\Delta\lambda = + 50 \text{ nm}$ ) ( $380 \text{ nm} - 330 \text{ nm}$ ) indique la présence d'un OH libre en 5.

Toutes ces données mènent à la structure finale 4', 5,7-trihydroxyflavone connue sous le nom Apigénine.



**Figure III.9 :** 4', 5,7-trihydroxyflavone

**Références bibliographiques**

[1] Kraft, K., Hobbs, C. (2004). Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.

[2] Hamia, C., Guergab, A., Rennane, N., Birache, M., Haddad, M., Saidi, M etyousfi, M.(2014). Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydant des extraits du rhanterium adpressium. Annales des sciences et technologie. Vol6. N° 1.

## Conclusion générale

---

### Conclusion générale

L'objet principal de ce travail est porté sur l'étude phytochimique de l'espèce médicinale, *Globularia alypum*L., utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier la purgation. L'étude bibliographique préalable réalisée sur cette espèce a montré qu'il n'existe pas beaucoup d'information de nature chimique et/ou biologique. Cependant, Au cours de nos travaux, nous avons pu isoler les métabolites secondaires majoritaires de cette plante mais l'identification structurale reste toujours limitée sur les composés phénoliques surtout les flavonoïdes.

La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques sur gel de silice 60 telles que la chromatographie sur colonne et couche mince. La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV).

L'étude phytochimique des feuilles et fleurs de *Globularia alypum* L. a permis d'isoler six produits naturels dont la plupart sont des dérivés flavoniques et des acides phénoliques, malheureusement nous avons pu d'identifier entre autres un seul produit qui est le 4',5,7-trihydroxyflavone connue sous le nom Apigénine. Ces résultats sont une contribution à l'étude phytochimique des plantes de la famille Globulariacée dans la pharmacopée algérienne en général et de la plante *globulariaalypum* en particulier.

## Conclusion générale

---

### Résumé

*Globularia alypum*L est une plante de la famille des Globularia cées, largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. A cause de sa richesse en métabolites secondaires comme les polyphénols (flavonoïdes et acides phénoliques), terpenoïdes, iridoïdes et les huiles essentielles, ses métabolites sont reconnues par leurs activités biologiques diverses telles que l'activité antioxydante, cytotoxique, antibactérienne, antifongique etc.

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique des parties aériennes de cette plante (fleurs et feuilles), la matière végétale séchée et broyée de cette plante a été soumise à une macération dans le méthanol / eau en proportion (80 / 20, v/v), l'extrait brut obtenu a été dilué dans l'eau distillé puis a subi une extraction liquide / liquide par les différents solvants (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol), l'extrait chloroformique obtenu est traité par les différentes méthodes de séparation chromatographique telles que la chromatographie sur colonne et couche mince de gel de silice, cette investigation a permis d'isoler six produits chimiques à l'état pur.

Vu le manque fortement marqué concernant les outils physicochimiques destinés pour l'élucidation structurale des produits naturels surtout la résonance magnétique nucléaire (RMN), nous avons pu grâce à la fluorescence sous lumière UV et la spectrophotométrie UV-Visible de déterminer un seul produit de type flavone, il s'agit de 4', 5,7-trihydroxyflavone.