

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N°d'ordre :.....

Série :.....

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Magister en Chimie Organique
Option : Synthèse organique et substances naturelles

Intitulé

*Contribution à l'étude phytochimique et biologique du Verbascum atlanticum batt.
(Scrofulariacée)*

Par :

KHENTOUL HALIMA

Sous la direction du Professeur :

M^{me} BOUMAZA OUAHIBA

Devant le jury

M^{me} F. BENAYACHE

M^{me} O. BOUMAZA

M^r S. BENAYACHE

M^{me} R. MEKKIOU

M^r R. SEGHIRI

Pr. Université Constantine 1 présidente

Pr. Université Constantine 1 rapporteur

Pr. Université Constantine 1 Examineur

Pr. Université Constantine 1 Examineur

Pr. Université Constantine 1 Examineur

Soutenu le.../.../...

Dédicace

*Je dédie ce travail en témoignage de la gratitude et de ma
profonde affection:*

*À ma très chère mère symbole grandiose de
patience, de sacrifice et d'amour. «Zahra»*

*À mon père où son âme soit en paix près de
" bon dieu"*

À mes frères et très chères sœurs

À mes beaux frères, à mes belles sœurs

À tous mes anges nièces et neveux

À toute ma promotion de magister :

*"Hanene, Nassima, Wassila, Feryal
Naima, Sabrina, Tamer, abass, Mohamed, Chafi,
karim"*

Remerciement

En premier lieu je tiens fortement à remercier «**le bon dieu**» qui m'entoure toujours par sa miséricorde.

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers mon encadreur le professeur Mme **W. Boumaaza** pour ses encouragements, sa patience, ses conseils, et pour les heures investies dans la correction du présent manuscrit;

Un spécial remerciement pour le professeur Mme **F. Benayache** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, pour ses conseils lucides et ses compétences scientifiques et d'avoir accepté de présider le jury de thèse;

Je remercie le professeur Mr **S. Benayache** de m'avoir accepté d'être un membre de chercheurs dans son laboratoire de valorisation des ressources naturelles, pour ces conseils encourageants, et surtout sa gentillesse et de faire partie de jury de thèse;

Je tiens aussi à remercier les professeurs : Mr **R. Seghiri** et Melle **R. Mekkiou** pour leurs conseils, ses encouragements et d'avoir accepté de faire partie de jury de thèse;

J'adresse mes remerciements chaleureux à : professeur **P. Mosset** (École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226, Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France) et les professeurs **F. León** et **I.I. Brouard** (Institut des Produits Naturels et l'agrobiologie, CSIC-Institut universitaire de Bio-Organique "Gonzalez Antonio", Université de La Laguna, Av. F. Astrophysique Sánchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Espagne) pour leur aide dans l'identification des structures des produits isolés par la réalisation des différents spectres RMN ;

Je remercie le professeur **DJ. Sarri** pour son aide dans l'investigation botanique de la plante et **D. Zaama** pour son aide dans l'investigation biologique de l'extrait *n*-butanol.

Je suis aussi très reconnaissante à toute l'équipe des chercheurs de laboratoire qui m'ont apporté tout au long de ma thèse leur aide, leur Soutien et leur bonne humeur surtout : **Hanene, Khawla, Widad , Samia, Lamia, Kawthar, Sara.A, Sara.B, Leila, Chahra, Samira, Amina et Tarek.**

Je voudrais remercier les ingénieurs : **Nawal** et **Hichem** pour leur aide, et leur disponibilité;

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

MeOH	Méthanol
EtOH	Ethanol
CHCl₃	Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
AcOEt	Acétate d'éthyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
R_f	Facteur de retardement (retardation factor)
RMNH¹	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
MHz	Mega Hertz
δ	Déplacement chimique
J(HZ)	Constante de couplage exprimée en Hertz
mg	Milligramme
C°	Celsius
ml	Millilitre
UV	Ultra Violet
NaOH	Hydroxide de sodum
HCl	Acide chlorhydrique
H₃BO₃	Acide borique
NaOAc	Acétate de sodium
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
Ara	Arabinose
Glu	Glucose
Gal	Galactose
Rha	Rhamnose
Xyl	Xylose

NO .CH	SOMMAIRE	PAGE.NO
	INTRODUCTION	2
I	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA FAMILLE SCROFULARIACEE ET LE GENRE <i>VERBASCUM</i> I-1-Présentation de la famille scrofulariacée I-1-1-caractéristique botanique..... I-1-2-quelques genres de la famille scrofulariacée..... I-2-présentation du genre <i>Verbascum</i> I-2-1- Description botanique..... I-2-2- Les espèces les plus connus et leur intérêt biologique I-2-3- Les métabolites secondaires du genre <i>Verbascum</i> I-2-4- Les activités thérapeutiques de genre <i>Verbascum</i>	4 4 5 5 8 10
II	LES METEBOLITES SECONDAIRES DU GENRE <i>VERBASCUM</i> Introduction..... II-1-Les terpènes II-1-1-Classification des terpènes..... II-1-2- Les grandes classes des terpènes et leurs activités..... II-2-Les saponines II-2-1- structure II-2-1-1- Les saponines terpéniques..... II-2-1-2- Les saponines stéroïdes..... II-2-2- Les activités et les utilisations des saponines..... II-3-Les flavonoïdes II-3-1-Structure des flavonoïdes..... II-3-2-Biosynthèse des flavonoïdes..... II-2-3-Les flavonoïdes hétérosides II-2-4-Les propriétés et applications des flavonoïdes..... II-2-5-Les sous -classes des flavonoïdes naturelles et propriétés associées.... II-2-6- Applications des flavonoïdes dans les plantes II-2-7- Intérêt biologique et pharmacologique des flavonoïdes	14 16 16 17 20 21 22 23 23 24 24 26 27 27 32 33 33
III	METHODES DE SEPARATION ETD'ANALYSES UTILISES : III-1- Les Méthodes de séparation..... III-2-Méthodes d'analyse physico-chimique	41 43
IV	ETUDE BOTANIQUE ET PHYTOCHIMIQUE DE <i>VERBASCUM ATLANTICUM</i> : IV-1- Etude bibliographique de <i>Verbascum atlanticum</i> IV-1- 1-Classification botanique..... IV-1-2- Description botanique..... IV-1-3-Répartition géographique..... IV-2-Etude chimique de <i>Verbascum atlanticum</i> IV-2-1- Récolte de la matière végétale..... IV-2-2- Criblage phytochimique (screening) de <i>Verbascum atlanticum</i> IV-2-3- Préparation des extraits bruts..... IV-2-4- Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	49 49 49 50 51 55 58

	IV-2-5- Séparation et purification	59
	RESULTATS ET DISCUSSION	
	V-1- Resultats et interpretation de criblage phytochimique (sreening).....	67
	V-2- Détermination structurale des produits isolés de <i>Verbascum atlanticum</i> ...	69
V	V-2-1- Determination de F9-4.....	69
	V-2-1- Determination de SF10-8-2-1.....	76
	V-2-3- Determination de SF10-20-1.....	84
	RESULTATS DE L'ETUDE BIOLOGIQUE DE <i>VERBASCUM</i>	
VI	<i>ATLANTICUM</i>	93
	CONCLUSION	98

Introduction
Générale

Introduction

Depuis toujours l'homme n'a cessé de chercher son bien être et de combattre sa douleur physique et morale par l'utilisation de tout ce que la terre peut lui offrir du règne végétal. Les remèdes égyptiens, grecques, romains et d'extrêmes- orient comprennent de nombreuses utilisations de plantes pour des prescriptions médicales et cosmétiques. La phytothérapie ou traitement par les plantes médicinales représente l'essentiel de l'arsenal thérapeutique jusqu'à la fin du XIX^e siècle. L'arrivée massive des médicaments de synthèse, forts de leur efficacité et leur présentation, prête à l'emploi a rapidement supplanté cette médecine douce.

Aujourd'hui, les aspects négatifs du développement industriel provoquent des changements climatiques, géologiques et surtout biologiques au niveau des micro-organismes pathogènes qui connaissent des mutations morphologiques permettant ainsi de résister à toute sorte d'attaque par les médicaments, ce qui met la santé humaine en danger. Devant cette situation délicate, la recherche de nouvelles molécules qui ont des propriétés thérapeutiques très larges et efficaces devient une nécessité qui impose le recours à la phytothérapie.

L'Algérie avec sa diversité climatique et sa richesse en flore, a mis un pas très important dans la recherche en phytochimie. Plusieurs espèces sont étudiées dans ce domaine, c'est le cas de ce présent travail qui porte sur une investigation phytochimique et biologique d'une espèce de plante du genre *Verbascum* appartenant à la famille des scrofulariacées, genre connu pour son action thérapeutique contre la tuberculose, et étudié pour la première fois au sein d'une équipe de notre laboratoire. L'espèce *Verbascum atlanticum* batt. objet de notre étude est non explorée jusqu'à aujourd'hui sur le plan phytochimique.

Chapitre I

Présentation de la

famille Scrofulariacée

et le genre Verbascum

I-1-Présentation de la famille scrofulariacée

Introduction :

La famille **scrofulariacée** est une famille de plantes dicotylédones. Ce sont des plantes herbacées, plus rarement des arbustes ou des arbres ^[1], comprenant environ 5100 espèces réparties en 269 genres largement répandus autour du monde ^[2].

I-1-1-Les caractéristiques botaniques ^[1] :

Des fleurs irrégulières, à corolle de cinq pétales généralement répartis en deux lèvres ; étamines postérieures fréquemment avortées et remplacées par une écaille, parfois deux étamines seulement.

A. Fleurs à corolle évasée, non en tube :

1. Fleurs grandes, de 2 cm au moins de diamètre, jaunes à quatre ou cinq étamines.

a) Cinq étamines : *Verbascum*

b) Quatre étamines : *Celia*

2. Fleurs petites, violacées ou blanches, de moins de 1cm, à deux étamines : *Veronica*.

B. Fleurs à corolle tubuleuse : *Anticharis, Scrofularia, Antirrhinum, Linaria*.

I- 1-2-Quelques genres de la famille scrofulariacée ^[2] :

- Les molènes (*Verbascum*) ;
- Les scrofulaires (*Scrophularia*) ;
- Les limoselles (*Limosella*).

I-2-Présentation du genre *verbascum*

Introduction :

Mieux connues sous les noms « Molène » ou « Bouillon », généralement additionnés d'un adjectif (noire, blanc, ...), les espèces du genre *Verbascum* font partie de la famille scrofulariacée. Ce genre compte plus de 360^[3] espèces et de nombreux hybrides, ce qui complique leur identification précise. De nombreuses espèces sont originaires de la région méditerranéenne, certaines sont du nord et du centre de l'Asie^[4].

I-2-1-Description botanique :

Ce sont des plantes herbacées, généralement robustes, de grande taille, leur hauteur moyenne étant comprise entre 80 et 120 cm, avec pour certaines (*V. thapsus* et *V. densiflorum*) des hauteurs maximales pouvant atteindre voir dépasser les 200 cm.

Les fleurs sont disposées en épis ou en grappes. La corolle, composée de cinq pétales presque égaux entre eux, est jaune ou blanche. Le calice est constitué de cinq lobes égaux. Toutes les fleurs des espèces du genre *Verbascum* possèdent cinq étamines : trois supérieures courtes et deux inférieures longues. L'observation des poils laineux présents sur les filets des étamines, est un critère important dans la détermination des espèces. Le fruit se présente sous la forme d'une capsule, plus ou moins globuleuse selon les espèces. Les feuilles du genre *Verbascum* sont alternes, généralement dentées irrégulièrement^[4].

I-2-2-Les espèces les plus connues et leur intérêt biologique :

I-2-2-1-*Verbascum thapsus* : cette espèce est connue sous le nom du « bouillon blanc ». Une plante bisannuelle à feuilles ovales légèrement laineuses et à fleurs jaunes disposées en cymes (2 m de haut).

Constituants : il contient des mucilages, des flavonoïdes, des saponines, des triterpènes, une huile essentielle et des pigments jaunes^[5].

Effets et usages médicinales :

Le bouillon blanc (figure 1) est un remède spécifique des trachéites et des bronchites, le bouillon-blanc soigne la toux. Préparée en infusion, les feuilles et les fleurs réduisent la formation de mucosités bronchiques et favorisent leur évacuation. Cette plante s'associe bien avec d'autres expectorants.

En application, elle possède des propriétés calmantes et cicatrisantes. En Allemagne, le bouillon blanc est utilisé en macérant les fleurs dans l'huile d'olive, le produit qui en résulte sert de remède contre les infections auriculaires et les hémorroïdes^[5].



Fig.1 *Verbascum thapsus*

I-2-2-2-Autres espèces de genre *Verbascum* ^[6] :

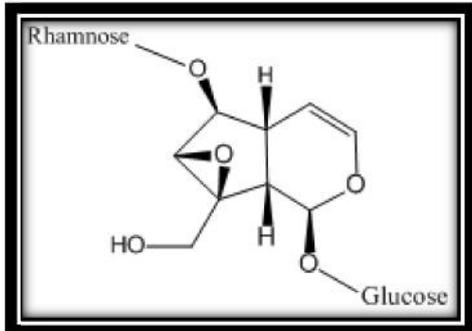
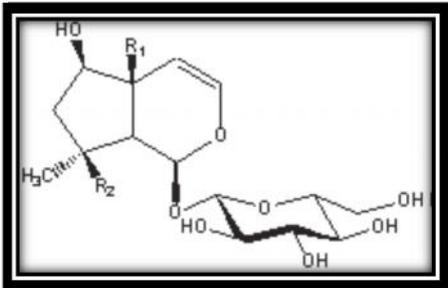
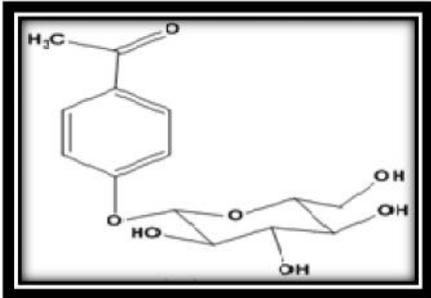
Plus de 250 espèces de genre *Verbascum* sont classées dans la systématique et des dizaines d'entre elles ont subi des investigations chimiques et biologiques. On peut citer quelques unes :

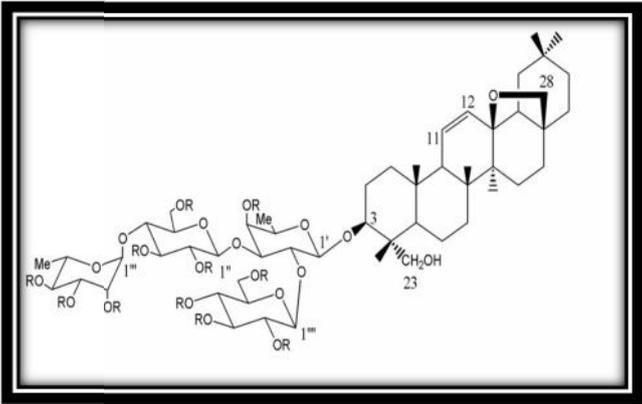
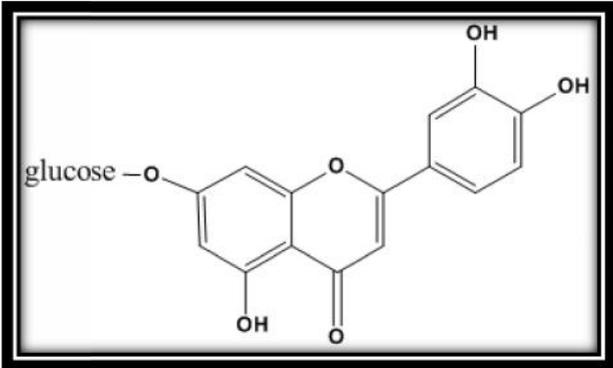
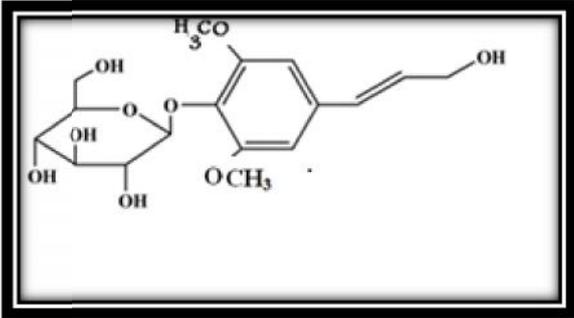
- molène blattaire (*Verbascum blattaria* L.)
- Faux bouillon blanc (*Verbascum densiflorum* Bertol.)
- molène faux-phlomis (*Verbascum phlomoides* L.)
- molène floconneuse (*Verbascum pulverulentum* Vill.)
- molène noire (*Verbascum nigrum*)
- molène lychnite (*Verbascum lychnitis* L.)
- *Verbascum lasianthum* Boiss.
- *Verbascum letourneuxii* Asch.
- *Verbascum pycnostachyum* Boiss.
- *Verbascum dentifolium*
- *Verbascum ballii* Batt.
- *Verbascum dudleyanum*

I-2-3-Les métabolites secondaires

Le tableau 1 représente quelques métabolites secondaires isolés de différentes espèces du genre *Verbascum*.

Tableau N°1 : les métabolites secondaires isolés de quelques espèces du genre *verbascum*

Type de composé	Molécules	Espèce								
Iridoïdes	 <p>6-O-(α-L-rhamnopyranopranosyl)-catalpol</p>	<i>Verbascum letourneuxii</i> , Asch. [7]								
	 <table border="0" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td>R1</td> <td>R2</td> </tr> <tr> <td>Ajugol</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Ajugoside</td> <td>H</td> <td>OCOCH3</td> </tr> </table>		R1	R2	Ajugol	H	OH	Ajugoside	H	OCOCH3
	R1	R2								
Ajugol	H	OH								
Ajugoside	H	OCOCH3								
Acétophénone glucoside	 <p>Picéine</p>	<i>Verbascum dudleyanm</i> [9]								

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Triterpénoïde saponine</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Ilwensisaponine A</p> </div>	<p><i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. [10]</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Flavonoïdes glycosides</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Lutéoline 7-O-glucoside</p> </div>	<p><i>Verbascum scardicum</i> [11]</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Phénylpropanoïdes</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Syringine</p> </div>	<p><i>Verbascum letourneuxii</i>. Asch [7]</p>

II-2-4- Les activités thérapeutiques :

II-2-4-1- Le genre *Verbascum* et la tuberculose :

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse due à la bactérie *mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch ^[12].

La tuberculose a laissé ses traces à travers l'histoire mais elle ne se considère pas comme une maladie du passé, aujourd'hui elle tue 5000 personnes chaque jour. L'organisation mondiale de la santé a déclaré une urgence mondiale pour la recherche d'un nouveau traitement contre la tuberculose surtout avec l'augmentation de sa résistance aux antibiotiques. La bactérie de la tuberculose a une structure qui lui permet de limiter toute introduction d'autre agent comme les antibiotiques tel que la rifampicine, ce qui nécessite d'augmenter la durée de la cure de 6 mois jusqu'à 9 mois ou plus ^[13].

Le genre *Verbascum* est utilisé dans plusieurs médecines traditionnelles surtout en Turquie pour traiter des infections pulmonaires telle que la bronchite et l'asthme autant qu'un expectorant, émollient, antitussif ^[14].

Après des investigations chimiques et biologiques des preuves ont montré que le genre *Verbascum* contient des classes des métabolites secondaires qui ont des propriétés biologiques contre la tuberculose ^[13] :

- ✓ les iridoïdes qui ont des propriétés anti microbiennes, lipolitiques surtout vers les bactéries gram+ comme *mycobacterium tuberculosis*.
- ✓ Les saponines qui ont des propriétés mucilagineuses pour traiter les parties enflammées.

II-2-4-2- les propriétés biologiques du genre *Verbascum* :

Les espèces de genre *Verbascum* contiennent des composés qui sont responsables d'activités biologiques très importantes :

II-2-4-2-1- Activité anti bactérienne, antivirale, anti fongique :

Le tableau 2 représente ces activités pour quelques espèces du genre *Verbascum* :

Tableau N°2 : Les activités anti bactérienne, antivirale, anti fongique prouvées de quelques espèces *Verbascum*

Espèce	Type de microorganisme pathogène
<i>Verbascum lasianthum</i> Boiss	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>candida albicans</i> ^[15]
<i>V.petrocalcium.var mentense</i>	
<i>Verbascum cilicium</i>	
<i>V. thapsus</i>	type de virus d'herpes K, <i>pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> et <i>E. coli</i> ^[14]
<i>V. macrurum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Saccharomyces pastorianus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[14]
<i>V.petrocalcium.var mentense</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> ^[15]

I-2-4-2- 2- Activité anti oxydante :

Des essais faits sur plusieurs espèces du genre *Verbascum* (*V. macrurum*, *V. wiedemannianum*, *V. salviifolium*, *V. lasianthum*) montrent leur capacité biologique contre les radicaux libres stables (diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), comparés au β –carotène et l'acide linoléique. Ses essais ont prouvé que les extraits des ces espèces sont évalués comme des conservateurs naturels et considérés comme des facteurs protecteurs (FrP) contre le rance à cause de leur richesse en phenylpropanoïdes glucosides qui sont très puissants comparés à alpha-tocophérol utilisé comme référence ^[14].

I-2-4-2- 3-Activité anti inflammatoire :

Dans la médecine traditionnelle turque, l'espèce *V. lasianthum* Boiss ex Bentham, est utilisée pour traiter les hémorroïdes et sur cette base des essais scientifiques *in vivo* ont montré que des composés isolés de cette espèce possèdent des actions anti inflammatoire et anti nociceptive sans effets toxiques ni gastriques ^[14].

I-2-4-2- 4-Activité anti tumorale et anti cancéreuse :

Le *Verbascum thapsus* avec ses composés ont des actions sur des ribosomes chez les rats ^[14].

I-2-4-2-5- Activité anti- ulcérogénique :

Les saponines sont des composés très présents dans le genre *Verbascum* et possèdent une action protectrice pour la membrane d'estomac qui inhibe l'excès des sécrétions gastrique et d'acide ^[14].

II-2-4-2- 6-Autre activités :

Le genre *Verbascum* possède des activités anti hépatotoxique, hyp tensive, immuno- modulatrice ^[14], vasoconstrictrice, anti diabétique, analgésique, immunostimulante et pesticide ^[15].

Références bibliographiques

- [1] Ozenda P. ; *Flore du Sahara Septentrional et Central* ; 1958 : p386.
- [2] Qureshi R., Bhatti G.R.; *Taxonomy of Scrophulariaceae from Nara Desert Pakistan*; *Pak. J. Bot.* **2008**; 40(3): 973-978.
- [3] Quezel F., Santa S.; *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Mericordionales* ; **1963** ; tomes II : p 830.
- [4] Gaston B , *Plantes Médicinales, Plantes mellifères, Plantes utiles et nuisibles* ; édition Belin ; **1986** : p39.
- [5] Ybert E. ; *Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinal* ; édition 2001 : p 181.
- [6] Arrif S ; *Étude des Métabolites Secondaires de Deux Scrophulariacées du genre Verbascum V. ballii et V. dentifolium*; université de Batna, soutenue en **2009**.
- [7] Shahat Emam S.; *Glycosides of Verbascum letourneuxii, Asch and its Antioxidant Activity*; Australian Journal of Basic and Applied Sciences; **2010**; 4(10): 5038-5050.
- [8] Tatli, I.I., Schühly, W. and Akdemir, Z.S. ; *Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of Verbascum pycnostachyum Boiss. & Helder flowers.*; university Hacettepe Journal of the Faculty of Pharmacy; January **2007**; V 27; N° 1: 23-32.
- [9] Tatli I.I., Schühly W., Kunert O., Bedir E. , Akdemir Z.S. ; *Secondary metabolites from the aerial parts of Verbascum dudleyanum and their biological activities*, Chemistry of Natural Compounds; **2008**; V 44(3) : 292-295.
- [10] Küpeli E., Tatli I. I., Akdemir Z. S., and Yesilada E.; *Bioassay-guided Isolation of Anti-Inflammatory and Antinociceptive Glycoterpenoids from the Flowers of Verbascum lasianthum Boiss. Ex Bentham*; Journal of Ethno pharmacology; **2007**: 444–450.
- [11] Naumov P. , Kusmanovski I.,Stefova M., *flavonoïds of verbascum scardicum and Melampyrum scardicum*; Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia; **1998**; V 17 N°1: 41–44.
- [12] Ybert E. , *Petit Larousse de la médecine* ; édition **2007** : p 1001.
- [13] McCarthy E., O'Mahony J.M.,*what's in a Name? Can Mullein Weed Beat TB Where Modern Drugs Are Failing?* ; Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; **2011**: p7.
- [14] Tatli I. I., Akdemir Z. S.; *Traditional Uses and Biological Activities of Verbascum Species*; Scientific review Pharm. Sci. **2006**; V31: 85-96.
- [15] Tatli I. I., Akdemir Z. S; *Antimicrobial and Antimalarial Activities of Secondary Metabolites from Some Turkish Verbascum Species*; research article; Pharm. Sci.; **2005**; V30: 84-92.

Chapitre II

Les métabolites

secondaires du

genre Verbascum

Introduction

Les plantes et les animaux produisent une gamme impressionnante de diverses substances chimiques. La plupart de ces produits sont basés sur le carbone et connus sous le nom de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont communs pour toutes les espèces et peuvent être subdivisés aux protéines, lipides, glucides et acides nucléiques. Les métabolites secondaires peuvent être subdivisés aux terpènes, alcaloïdes, shikimates et polyketides (figure 2).

Cette classification est basée sur les moyens par lesquels sont synthétisés. Les métabolites secondaires peuvent être communs ou spécifiques à une espèce. Les espèces relatives qui ont le même modèle de production de métabolites secondaires peuvent être classées par leurs métabolites, c'est la taxonomie^[1].

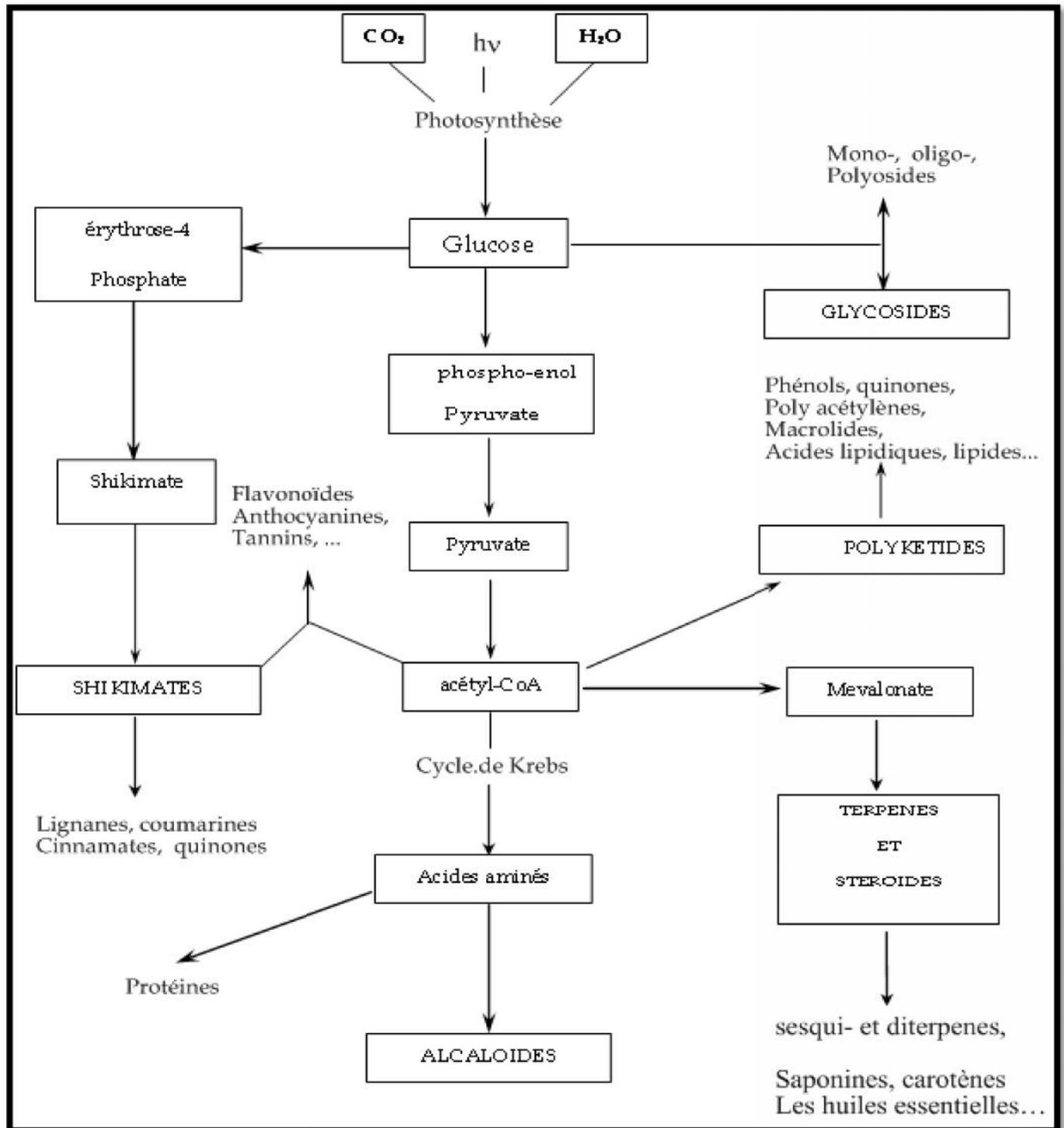


Fig.2 : Présentation schématique de formation de produits naturels [2].

Dans le genre *Verbascum* les métabolites secondaires les plus connus sont :

II-1-Les terpènes

Introduction :

Le nom terpène est dérivé de produits isolés de la "turpentine" et le suffixe "ène" indique la présence de la double liaison ^[1]. Les terpènes sont des produits définis par leur structure qui est basée sur une seule unité d'isoprène méthyle-2 buta-1,3- diène (figure 3), la multiplication de cette unité définit le nom de l'isoprénoïde ^[3].

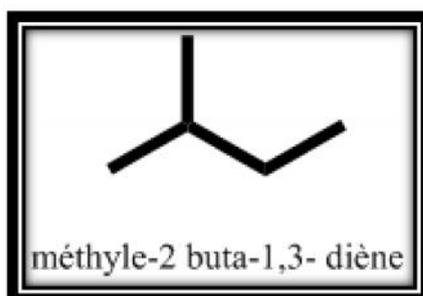


Fig.3 : Unité isoprène

II-1-1-Classification des terpènes ^[1] : La classification des terpènes est représentée dans le tableau 3 :

Tableau N°3 : Classification des terpènes :

Nom	Nombre d'isoprène	Nombre de carbone
Hemiterpènes	1	5
Mono terpènes	2	10
Sesquiterpènes	3	15
Di terpènes	4	20
Ses terpènes	5	25
Tri terpènes	6	30
Tetraterpènes	8	40
Poly isoprènes	>8	>40
Stéroïdes		
Carotènes	8	40

II-1-2- Les grandes classes des terpènes :**II-1-2- 1- Les monoterpènes :****II-1-2- 1-1- Les huiles essentielles :**

Elles sont présentes en quantité appréciable chez environ 2000 espèces de 60 familles végétales. Leur structure peut être linéaire, monocyclique ou bicyclique ^[4]. Les huiles essentielles sont volatiles, entraînaibles à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable ^[5].

Les fonctions des huiles essentielles ^[6] :

En plus de leur emploi en industrie pour leur saveur et odeur, les huiles essentielles ont des activités biologiques importantes

- Activité antiseptique, cicatrisante, analgésique ;
- Activité antimicrobienne, antiparasitaire, antifongique;
- Activité antioxydant.

II-1-2- 1-2- Les iridoïdes :

Les iridoïdes sont des monoterpènes avec un squelette d'un cyclopentane fusionné à un hétérocycle oxygéné à six (Fig.4) ^[7].

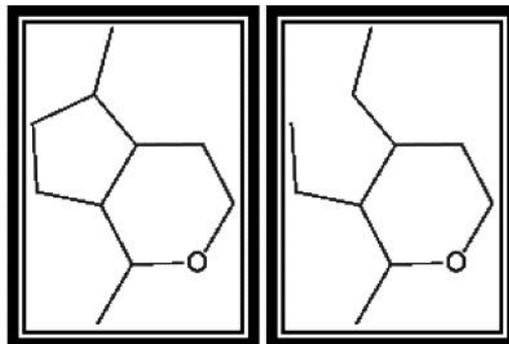


Fig.4 : Squelette des iridoïdes et secoiridoïdes

Les iridoïdes peuvent s'attacher aux sucres pour donner des iridoïdes hétérosides ex. : aucubin (figure 5).

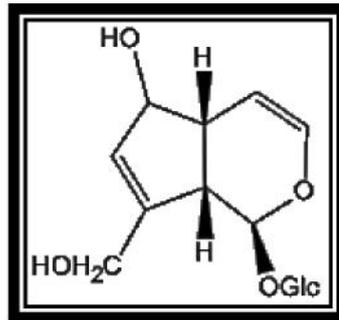


Fig.5 : L'aucubin un iridoïde glycoside

Propriétés biologiques des iridoïdes :

Les iridoïdes sont des composés largement répandus dans la nature, et principalement connus pour être des principes actifs de plantes jouissant d'un usage non négligeable en phytothérapie. Ils sont utilisés en traitement des désordres digestifs, la fièvre et le soulagement des douleurs ^[8].

Les iridoïdes glycosides possèdent des activités cholérétiques, purgatives, protectives du foie, vasoconstrictrices, sédatives, antimicrobiennes, anti diabétiques, analgésiques, anti tumorales, anticancéreuses, immunostimulantes and anti-inflammatoires ^[9].

II-1-2-2- Les sesquiterpènes :

Les sesquiterpènes forment une classe des terpènes dont le préfixe "*sesqui*" provient du latin et signifie "un et demi" ^[10]. Les Sesquiterpènes contiennent trois unités d'isoprène C₁₅ avec différents types de structure ex. : la buddlindeterpene B ^[11] (figure 6), une large gamme de sesquiterpènes contiennent un cycle γ -lactone et sont connus sous le nom des sesquiterpène lactones ^[8].

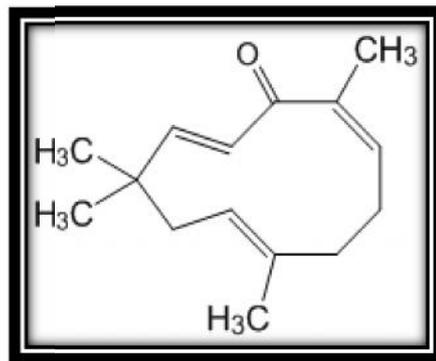


Fig.6 : buddindeterpene B

Les activités et les utilisations des sesquiterpènes :

Ils ont des activités anti-inflammatoires modérées surtout pour les arthrites. L'activité antimicrobienne des sesquiterpènes est prouvée *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs bactéries comme le staphylocoque doré avec une activité antifongique^[8]. Les sesquiterpènes lactones sont de très bons antiseptiques et analgésiques^[12] et jouent un rôle important neurotransmetteur dépressif^[13].

II-1-2- 3- Les diterpènes :

Les diterpènes sont des dérivés d'isoprène avec C₂₀, ils peuvent être cycliques ou acycliques. Les diterpènes sont très répandus et très variés de leurs structures, leur nombre, leur nature. Les différentes classes des diterpènes sont distribuées selon l'ordre alphabétique de leur référence^[12] ex. : la buddindeterpene C^[11] (figure 7).

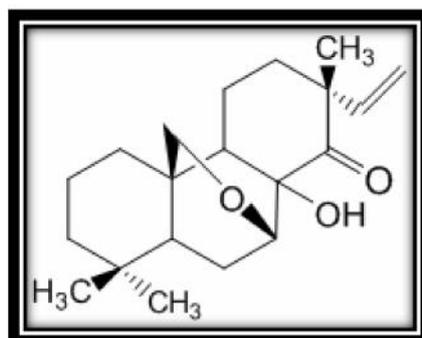


Fig.7 : Buddindeterpene C

Les activités et les utilisations de diterpènes :

Les diterpènes ont des propriétés biologiques très intéressantes prouvées après plusieurs essais :

- Activité anti VIH ^[4].
- Activité anti-inflammatoire ^[13].
- Activité anti-tumorale ^[13].
- Activité anti- cancer pour le traitement de différents types de cancers de poumons, cancer du sein, des ovaires ^[6].

II-2-Les saponines

Introduction :

Les saponines sont extrêmement complexes (hétérosides appartenant aux triterpènes cycliques ou aux stéroïdes). Les saponines terpéniques sont acides et les saponines stéroïdes sont neutres. Les saponosides (saponines hétérosides) sont composées d'un noyau lipophile (aglycone, sapogénine) et d'une ou plusieurs chaînes de sucres hydrophiles (glycone), variables selon le type de saponine ^[14].

La figure 8 représente les deux parties d'une saponine.

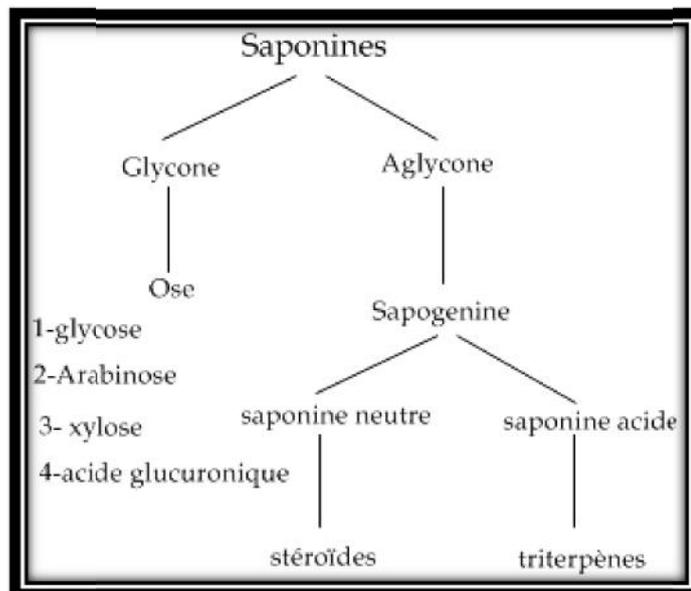


Fig.8 : Les deux parties d'une saponine ^[15]

II-2-1-Structure :**II-2-1-1-Les saponines terpéniques :**

Le squelette pentacyclique des triterpènes (fig.9) est la base de la structure des saponines terpéniques. Les saponines terpéniques sont rares dans les monocotylédones, mais ils sont abondants dans beaucoup des familles des dicotylédones .La forme de β -amyrine (fig.10) est fréquemment rencontrée ^[14].

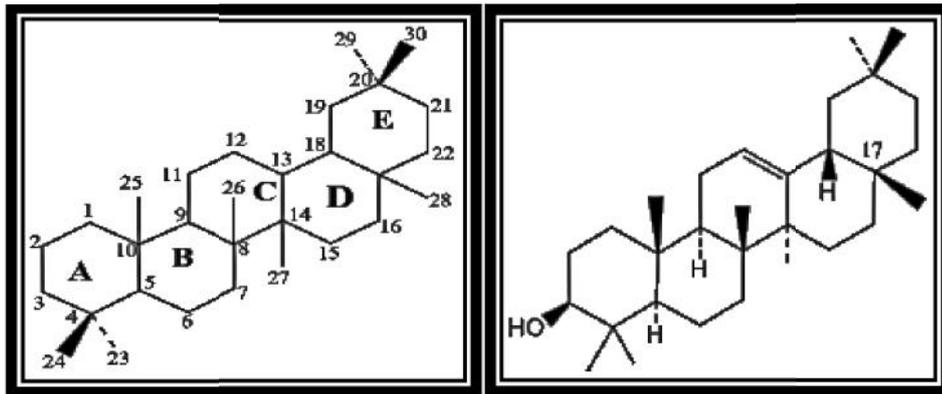


Fig.9 : Squelette des triterpènes fig.10 : β -amyrine

L'oxydation dans des sites particuliers (figure 11) conduit à la formation des triterpènes acides (la partie aglycone : saponine) ^[8]

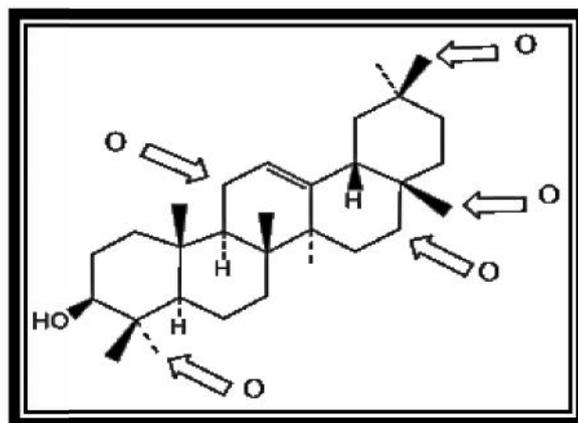


Fig.11 : Les emplacements particuliers d'oxydation

Plusieurs utilisations médicinales sont basés sur les sous-groupes de la β -amyrine (fig10) qui possèdent des groupes d'acides carboxyliques dérivés par l'oxydation des groupe hydroxy - méthyle en position 4 (C-23), 17 (C-28) et 20(C-30) dans le cycle aglycone. Les groupes formyle ($-\text{CHO}$) ou hydroxyle méthyle ($-\text{CH}_2\text{OH}$) peuvent être rencontrés, les positions 11 et 16 peuvent aussi être oxygénés. Les sucres sont habituellement attachés au 3-hydroxyle, et peuvent contenir jusqu'à six unités monosaccharide, les plus commun sont le glucose, le galactose, le rhamnose, l'arabinose, le xylose avec des unités d'acide uronique (acide glucuronique et acide galacturonique)^[7].

II-2-1-2-Les saponines stéroïdes :

Les saponines stéroïdes ont des propriétés biologiques similaires aux saponines terpéniques. Ils sont trouvés dans plusieurs familles des monocotylédones, leurs sapogénines en C27 stéroïls dans lequel la chaîne latérale du cholestérol (fig. 13) a subit des modifications pour produire un spirocétal. Toutes les saponines stéroïdes ont la même configuration au centre C-22. Les sucres sont trouvés en position 3(environ 3 monosaccharide) donc moins d'unités monosaccharides que dans les saponines terpéniques^[7] (la figure 12 représente la numérotation des stéroïdes).

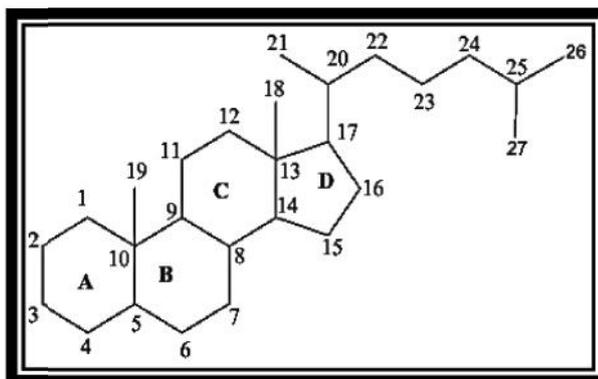


Fig.12 : Numérotation des stéroïdes

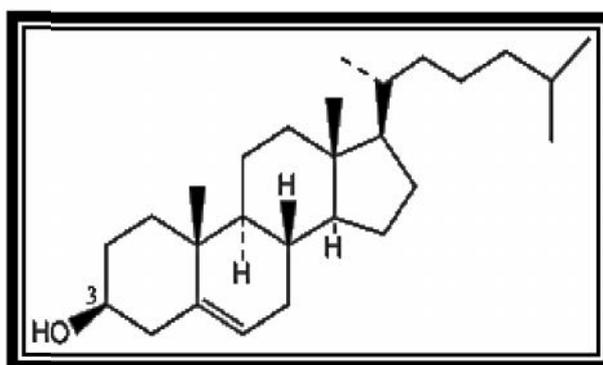


Fig.13 : Squelette de cholestérol

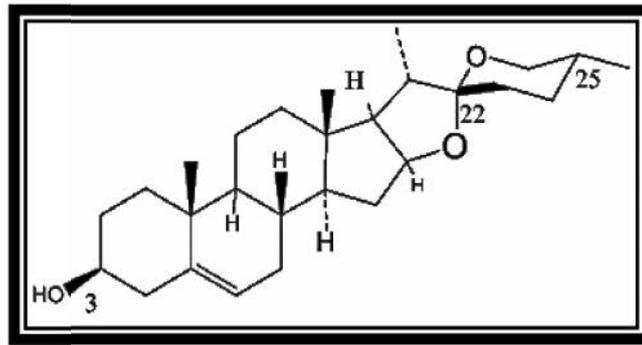


Fig.14 : La partie sapogénine des saponines stéroïdes

II-2-2-Les activités et les utilisations des saponines :

Les saponines sont connues par leur utilisation dans l'industrie comme:

- Des détergents ^[16]
- Des émulsifiants ^[17]
- Les sapogénines stéroïdes sont utilisés dans la semi synthèse des corticoïdes et les hormones sexuelles ^[18].

En plus plusieurs investigations ont montrés des activités biologiques des saponines très intéressantes:

- Un effet accélérateur du transit gastro-intestinal et un effet inhibiteur d'acide stomacal ^[19] ;
- Un effet antioxydant et protecteur des protéines ^[20];
- Utilisé comme un poison pour plusieurs type des animaux surtout les poissons ^[21];
- Un effet antimicrobien, anti mycologique, antibactérien, antiviral, analgésique, anti tumoral, pesticide, antiémétique et antitussif ^[22] ;
- Un effet hémolytique ^[23] ;
- Un effet anti-inflammatoire ^[24] ;
- Un effet expectorant ^[25], hypoglycémiant ^[26], Immunostimulant ^[27].

II-3- Flavonoïdes

Introduction :

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly phénols. Il s'agit de métabolites secondaires regroupés selon leur structure. Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 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 ^[28]. Les flavonoïdes sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles ^[29].

II-3-1-Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont une structure particulière bien définie comme montre la figure15. On peut voir généralement, des molécules qui ont deux anneaux de benzène (ou aromatiques) reliés par une chaîne de trois atomes de carbone, donc le squelette est composé de quinze carbones $C_6C_3C_6$ ^[29].

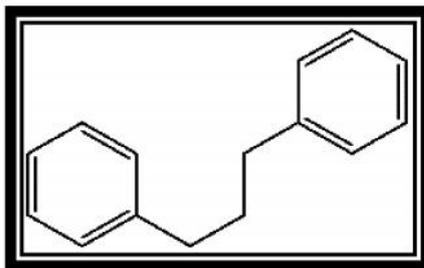
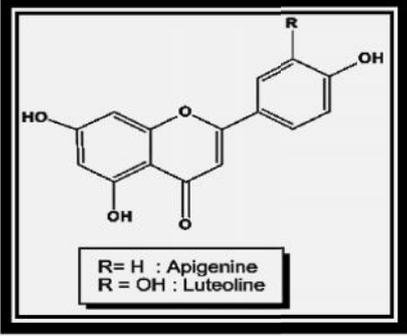
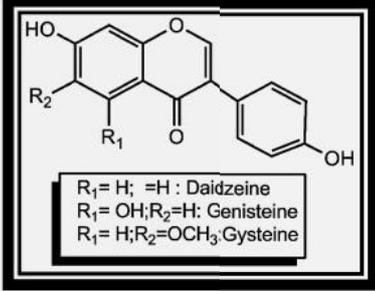
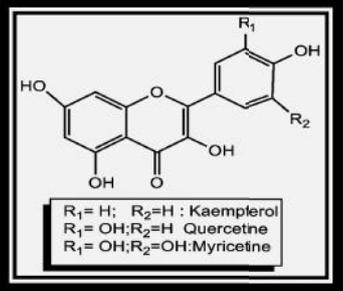
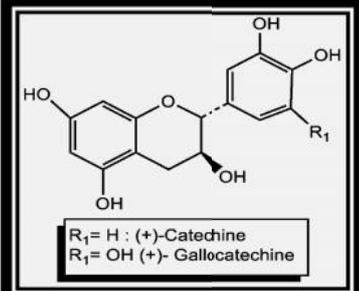
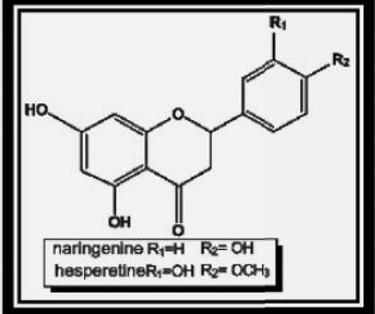
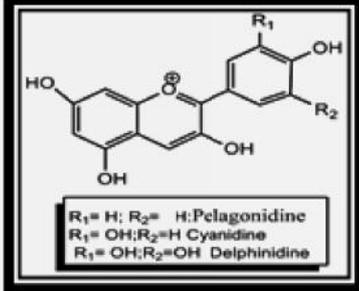
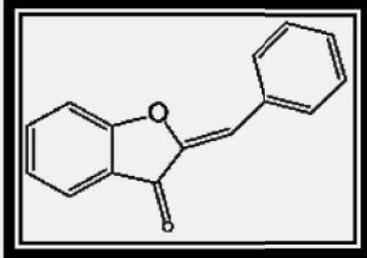
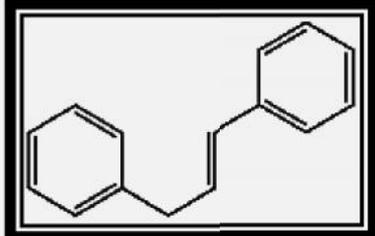


Fig.15 : Structure de base des flavonoïdes (1,3-diphénylpropane) ^[30]

Les flavonoïdes peuvent être classés en des sous classes selon le degré d'insaturation et d'oxydation présents dans l'hétérocycle C. Les sous classes incluent les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavan-3-ols, les anthocyanes, les isoflavones, les chalcones et les aurones et sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau N°4 : Les sous-classes des flavonoïdes [30] :

Flavones	Isoflavones (la bague B phénol est liée à l'atome C3 du cycle pyrone)
 <p>R= H : Apigénine R= OH : Lutéoline</p>	 <p>R₁= H; =H : Daïdzeïne R₁= OH; R₂=H : Genisteïne R₁= H; R₂=OCH₃: Gysteïne</p>
Flavonols	Flavanols (pas de groupe carbonyle en position 4 du cycle C)
 <p>R₁= H; R₂=H : Kaemplerol R₁= OH; R₂=H : Quercétine R₁= OH; R₂=OH: Myricétine</p>	 <p>R₁= H : (+)-Catéchine R₁= OH (+)- Gallocatechine</p>
Flavanones	Anthocyanidines (flavylium cation)
 <p>naringénine R₁=H R₂= OH hespérétine R₁=OH R₂= OCH₃</p>	 <p>R₁= H; R₂= H: Pelagonidine R₁= OH; R₂=H Cyanidine R₁= OH; R₂=OH Delphinidine</p>
Aurones	Chalcones
	

II-3-2-Biosynthèse des flavonoïdes

Depuis plusieurs décennies, l'analyse et la compréhension du métabolisme phénolique, plus particulièrement celui des flavonoïdes, constituent un réel défi pour un grand nombre d'équipes scientifiques. Puis ces vingt dernières années, le génie génétique précis des réactions enzymatiques, un grand nombre de sous-classes de flavonoïdes deviennent des intermédiaires (la figure16), le tableau 5 décrit quelques molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes [31].

Tableau N°5 : Les enzymes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes :

Enzymes	Intermédiaires synthétisés
CHS (Chalcone synthase)	Chalcone
CHI (Chalcone Isomérase)	Flavanone
FS (Flavone Synthase)	Flavone
F3H (Flavanone-3-Hydroxylase)	Dihydroflavonol
FLS (Flavonol Synthase)	Flavonol
Chaîne enzymatique	Dérivés anthocyaniques
AS (aurone synthase)	aurone

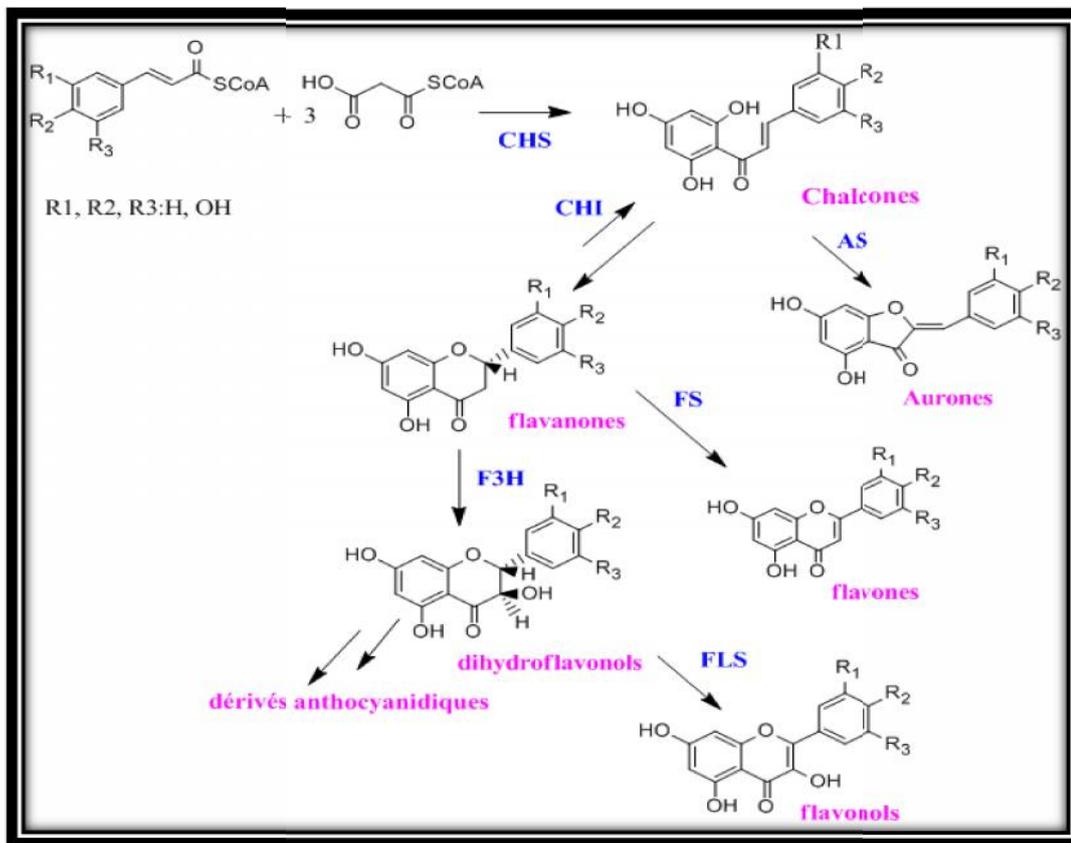


Fig.16 : Biosynthèse des flavonoïdes [32]

II-3-3-Les flavonoïdes hétérosides :

Les flavonoïdes peuvent être trouvés sous forme libre ou liée à des sucres pour former des hétérosides. Elles peuvent survenir comme O- hétérosides ou C- hétérosides. Contrairement aux O- hétérosides les C- hétérosides ne s'influencent pas par l'hydrolyse acide^[33].

La partie aglycone s'appelle génine et la liaison génine-ose existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique de ou des ose(s)^[34].

Les positions d'attachement sont celles en 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8 si ces positions sont hydroxylées.

Les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont : le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose, et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose. Les sucres les plus couramment rencontrés sont le D-glucose et le L-rhamnose^[34].

La présence d'un sucre modifie les propriétés de la molécule par rapport à son analogue non sucré en particulier sa solubilité et son hydrophobicité^[35].

II-3-4-propriétés et applications des flavonoïdes :

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des flavonoïdes vu leur grand intérêt pour la santé^[35] :

II-3-4-1- Solubilité des flavonoïdes :

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

- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde^[36].

II-3-4-2- Absorption des rayonnements UV :

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre. Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle^[37] comme l'indique le schéma suivant :

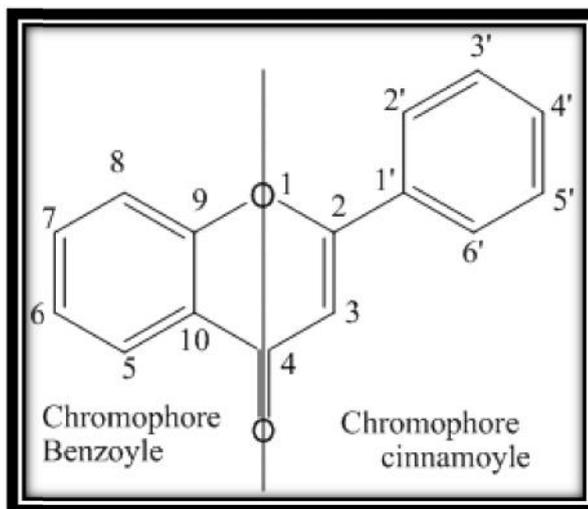


Fig.17 : Les deux chromophores des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont des comportements marqués en présence des réactifs qui peuvent être un indice de leur identification dans les spectres UV visible, le tableau 6, représente les déplacements observés en présence des réactifs.

Tableau N°6 : Les déplacements observés dans la présence des réactifs :

Réactif	Déplacement en nm		Interprétation
	<i>Bande I</i>	<i>Bande II</i>	
MeOH	304-350 352-385 328-380	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol OR en 3
+NaOH	+44 à 65 1. avec stabilité d'intensité 2. avec diminution d'intensité une nouvelle bande		4'-OH OR en 4' et OH en 3 7-OH
+NaOAc		+ 5 à 20 *Déplacement diminue en présence R en 6 *Pas de déplacement ou très faible	7- OH 7- OR
H3BO3	+ 12 à 36 -12		3', 4' di OH 6,7 ou 7,8 OH
AlCl3	Une seule bande entre 420-430. Une seule bande entre 440-460		Ortho di-OH sur B (flavone) Ortho di-OH sur B (flavonol)
AlCl3/ MeOH	+ 20 à 45		5- OH
AlCl3+HCl/MeOH	+ 17 à 20 + 35 à 55 + 50 à 60		5- OH (avec 6-oxygénation) 5-OH flavone et 3-OR flavone 3-OH avec ou sans 5-OH
AlCl3+HCl/AlCl3	-20 à -40avec une bande ou épaulement entre 350-360 nm -20 à -25		Ortho di OH (noyau B) Ortho di OH sur A et B ou tri-OH sur B.

II-3-4-3- Les spectres RMN proton et les flavonoïdes :

Les spectres RMN proton des flavonoïdes sont très spécifiques surtout dans la zone située entre 6ppm et 8ppm où se trouvent les protons des cycles A et B (figure18).

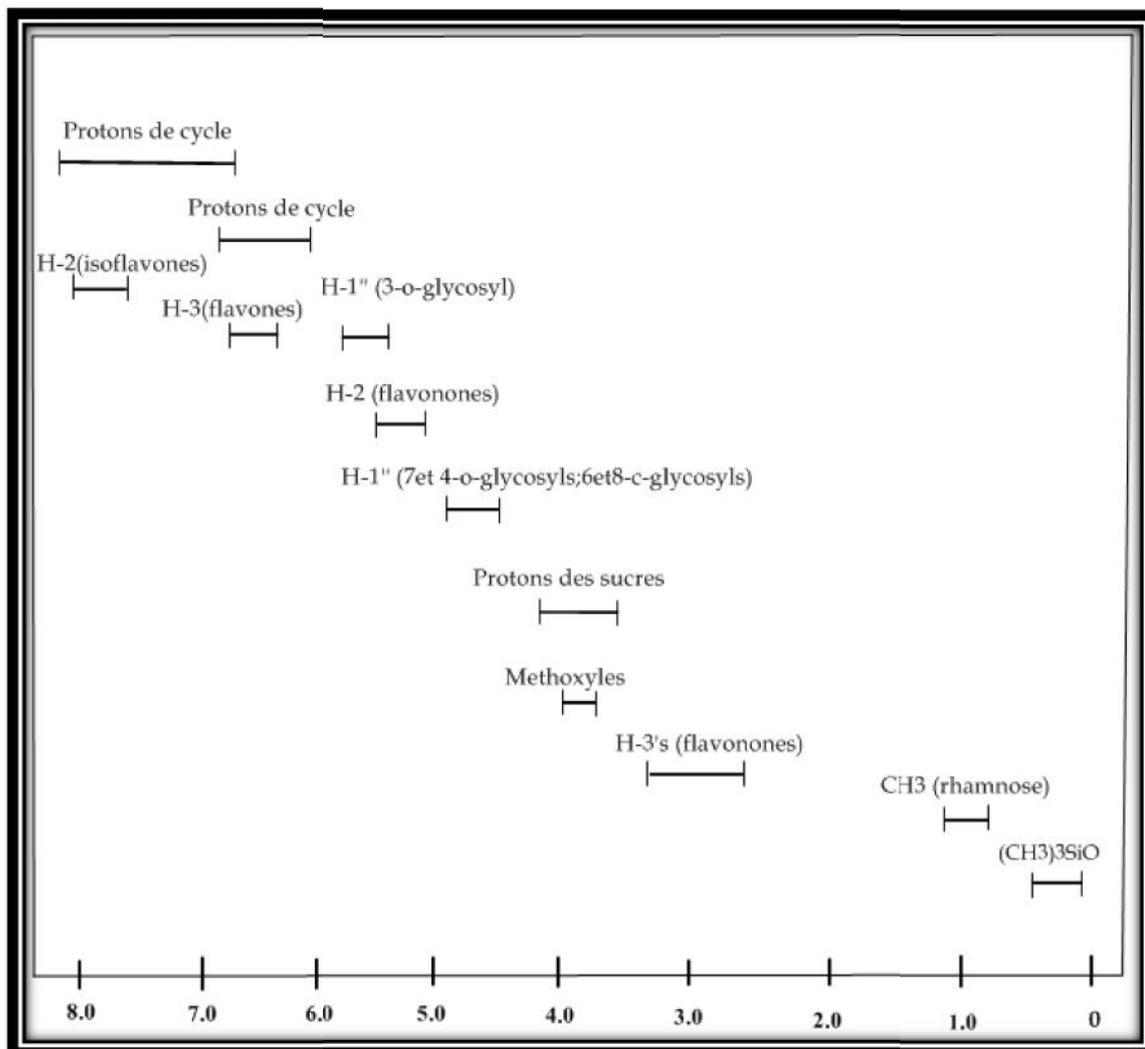


Fig.18 : Les déplacements approximatifs des protons des flavonoïdes ^[38]

II-3-4-4-Effet du rapport frontal (R_f) :

Le rapport frontal (R_f) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front du solvant d'autre part.

La valeur du R_f varie avec la nature de l'éluant utilisé (organique ou aqueux), le type du support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glucosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique ^[36].

II-3-5- Les sous - classes des flavonoïdes naturelles et propriétés associées :

II-3-5- 1-Chalcones :

Un grand nombre de chalcones ont été décrites dans la littérature. Ces molécules naturelles sont toutes hydroxylées et / ou méthoxylées. Elles ont, entre autres, un rôle de chromophore dans le règne végétal car elles se caractérisent par une couleur jaune vif (bande d'absorption empiétant dans le visible) ^[39].

II-3-5-2- Flavanones :

Les flavanones sont abondants chez les agrumes, mais peu rencontrées chez les autres fruits. Le genre Citrus est caractérisé par une forte accumulation de flavanones glucosides et peu aglycone comme la naringénine (fig.19) ^[40]. Par ailleurs, les flavanones interviennent dans la relation structure – degré d'amertume. Par exemple la naringénine est amère. La naringénine et ses dérivés sont exploitables d'un point de vue alimentaire en tant qu'agents d'amertume ou initiateurs de produits sucrés ^[41].

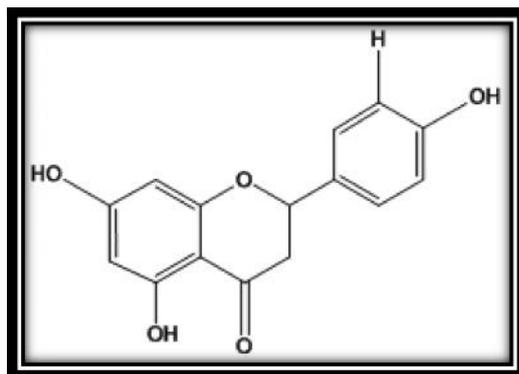


Fig.19 : La naringénine

II-3-5- 3-Flavones :

Les flavones sont abondantes chez les plantes supérieures sous forme aglycones ou glycosides. Certaines, comme la lutéoline (Fig.20), sont en partie responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses. Ce sont des molécules peu colorées, mais qui absorbent à des longueurs d'onde caractéristiques ($\lambda = 210-270$ nm, 310 nm). Par exemple, elles sont parfaitement discernables par les abeilles, dont la perception visuelle s'étend à une partie de l'ultra-violet ^[42].

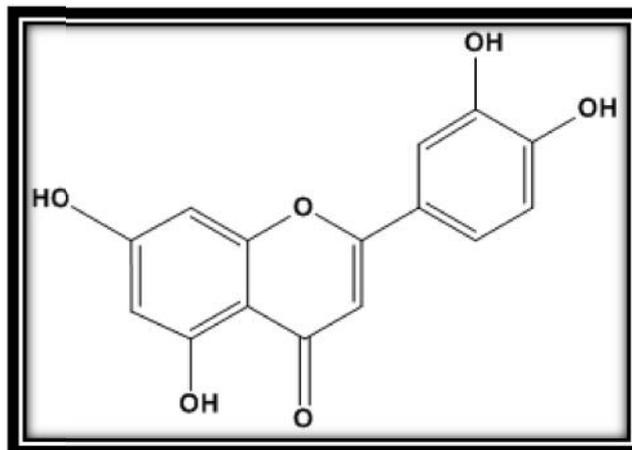


Fig.20 : La lutéoline

II-3-5- 4-Flavonols :

Les flavonols sont très répandus dans le règne végétal. De ce fait, ils sont abondants dans l'alimentation. On citera le kaempférol, la quercétine. Ils peuvent participer à la couleur jaune de certaines fleurs (fleur du cotonnier). On retrouve les flavonols principalement sous forme glycosides dans les fruits et les légumes. Ils sont utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement d'ictères (coloration jaune de la peau) ^[43].

II-3-5- 5-Dérivés anthocyaniques :

Les anthocyanidines et les anthocyanes ont en commun le squelette flavylum. Ce motif a la particularité d'être un chromophore, ainsi ces flavonoïdes sont des pigments naturels très fréquemment rencontrés chez les végétaux ^[31]. Ils sont en partie responsables des nuances de couleur rouge ($\lambda = 490-500$ nm), violette ($\lambda = 560-580$ nm) et bleue ($\lambda = 580-595$ nm) des fruits et des fleurs. Une consommation régulière de ces flavonoïdes est associée à une réduction du risque de plusieurs maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou encore la maladie d'Alzheimer ^[44].

II-3-5- 6-Aurones :

Les aurones sont formés par la cyclisation des chalcones. Les aurones sont aussi des pigments jaunes présents dans les fleurs ^[31].

II-3-6- Applications des flavonoïdes dans les plantes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [33].

II-3-7- Intérêt biologique et pharmacologique des flavonoïdes :

Introduction :

Des études précliniques et cliniques disent que les flavonoïdes ont un potentiel pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies et peuvent jouer un rôle très important dans la diminution de risque des maladies [45].

II-3-7- 1-Activité anti microbienne :

Les flavone, flavonols, isoflavones et leurs dérivés méthoxylés montrent des Activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries gram(+) et gram(-) comme *Escherichia coli* (*E coli*), *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* (*H pylori*), *Pseudomonas maltophilia* et une activité antivirale contre les virus d' Herpes Simplex, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus d'Influenza A, B [46].

II-3-7- 2-Effet anti diabétogène et cytoprotecteur :

Le diabète sucré est aujourd'hui une maladie métabolique grave menaçante, d'une manière croissante, la santé publique dans le monde. Des flavonoïdes tels que la quercétine a un potentiel cytoprotecteur des cellules β des îlots de Langerhans contre le biais de la formation excessive des radicaux libres. L'activité de ces flavonoïdes se traduit par un effet significativement positif sur l'insulino-sécrétion des cellules β et la glycémie [47].

II-3-7- 3-Protection vasculaire :

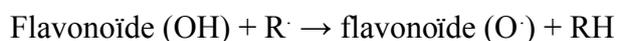
Les données épidémiologiques récentes montrent un intérêt particulier du cacao en raison de sa forte concentration en flavonoïdes totaux et des effets cardiovasculaires cliniquement significatifs. Une étude prospective majeure, publiée en 2007, a porté sur 34 489 femmes ménopausées et indemnes de toutes pathologies cardiovasculaires avec un suivi de 16 ans, les patientes dont la consommation la plus élevée en flavonoïdes en particulier le cacao présentent une réduction significative de la mortalité cardiovasculaire. Parallèlement de nombreuses études montrent un effet bénéfique du cacao, principalement sur la tension artérielle (diastolique et systolique), l'insulinorésistance, une réduction de 12 % des concentrations plasmatiques de LDL cholestérol, la fonction vasculaire et la fonction plaquettaire [48].

II-3-7- 4-Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres :

Les radicaux libres apparaissent dans plusieurs situations, telles que :

- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion super oxyde ($O_2^{\cdot -}$) ;
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes activés, et, par dismutation, à celle du très réactif radical hydroxyle ($OH\cdot$) ;
- l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides, notamment les particules de LDL de l'intima vasculaire, qui constitue une phase dans la cascade athérogène.

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité anti oxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($OH\cdot$), anions super oxydes ($O_2^{\cdot -}$) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles ($OH\cdot$) [49].

II-3-7-5- Un espoir pour le Cancer :

Plusieurs inquiétudes sont lancées vis à vis de l'augmentation des taux du cancer dans le monde et avec l'utilisation de la chimiothérapie qui est toxique pour les cellules, des nouvelles prépositions sont suggérées pour la prévention contre certains types du cancer par l'utilisation des produits naturels comme les flavonoïdes ^[49]. En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse par la fragilisation des chromosomes. Ils inhibent en plus, la prolifération cellulaire qui affecte le potentiel invasif des cellules tumorales ^[33], ils réagissent aussi contre les phénotypes de métastase ^[50].

II-3-7- 6-Action anti –inflammatoire :

Des études récentes montrent que la lutéoline et ses dérivés glycosides ont des actions biologiques très efficaces par l'inhibition des enzymes pour la synthèse de thromboxane B₂ et leucotriène B₄. Ces deux composés sont responsables de plusieurs inflammations telles que la cirrhose, les thromboses, la goutte, psoriasis et l'asthme ^[51].

References bibliographiques

- [1] Sell C. S.; *Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*; The Royal Society of Chemistry (R.S.C.); édition 2003: p1-2.
- [2] Ikan R.; *selected topics in the chemistry of natural products*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; édition 2008: p7.
- [3] Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H.; *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; Wiley-Blackwell; édition 2006: p47.
- [4] Louis S. ; *diversité structurale et activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses* ; l'institut national des sciences appliquées de Lyon; thèse soutenue le 20 février 2004.
- [5] Bruneton J. ; *pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales* ; Tec & Doc – Lavoisier ; édition 1993 : p278-279.
- [6] Mohammedi Z. ; *Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen* ; université de Tlemcen ; thèse soutenue année 2005-2006.
- [7] Dewick P. M.; *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach 3rd Edition*; Eberhard; 2009: p207-243.
- [8] Barnes J., Anderson L. A. Phillipson J. D.; *Herbal Medicines*; Pharmaceutical Press; 2007: p102-194.
- [9] Arrif S. ; *Étude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre Verbascum: V. ballii et V. dentifolium* ; Université El Hadj Lakhdar-BATNA ; thèse soutenue l'année 2008/2009.
- [10] Breitmaier E. ; *Terpènes (flavors, fragrances, pharma, pheromones)* ; Wiley-VCH ; édition 2006 : p 3.
- [11] Hussain H., Aziz S., Miana G. A., Ahmad V. U., Anwar S., Ahmed, I.; *Minor chemical constituents of Verbascum Thapsus*; Biochemical Systematics and Ecology; 2009; V37: p124–126.
- [12] Gideon P.; *biochemical targets of plant bioactive compounds*; a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects; 2003: p33-40.
- [13] Kraft K; *Pocket Guide to Herbal Medicine*; Thieme Stuttgart; New York; 2004: p2.
- [14] Paul M Dewick; *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*; seconde édition; John Wiley & Sons; Ltd; 2002: p 219-237.

- [15]] Edwards C. R. ,Benediktsson R.,Lindsay R. S.,Sekl J.R.; ***11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects***; Steroids ; **1996**; V61(4): 263-9.
- [16] Yu-Fen C., Chao-Hsun Y., Ming-shiang C., Yong -ping C., Yu-Chun H.; ***Foam Properties and Detergent Abilities of the Saponins from Camellia oleifera***; International Journal of Molecular Sciences; **2010**;V 11: 4417-4425.
- [17] Ceyhun Sezgin A.E, Artik N.; ***Determination of Saponin Content in Turkish Tahini Halvah by Using HPLC***; advance journal of food science and technology; **2 0 1 0**; V 2(2): 109-115.
- [18] Joseph L., Mayo, M.D., Facog; ***A Natural Approach to Menopause***; applied nutritional science reports; **1999**; V 5 N° 7.
- [19] Toshiyuki M., Junko N. A., Tadashi K. A., Hisashi M. A., Masayuki Y.; ***Bioactive Saponins and Glycosides. XVII.1) Inhibitory Effect on Gastric Emptying and Accelerating Effect on Gastrointestinal Transit of Tea Saponins: Structures of Assamsaponins F, G, H, I, and J from the Seeds and Leaves of the Tea Plant***. Chem. Pharm; Bull; **2000**; V 48 N°11.
- [20] Nilesh K. S. , Prasad R.; ***Saponin glycosides as natural antioxidant from Aegle marmelos and their protective role in oxidative damage to protein***; biochemistry; **2012**.
- [21] Yılmaz Y., Naki O.; ***A New Saponin from Verbascum ancyritanum Bornm***; J. Fac. Pharm; **1996**; V 25 N°1.
- [22] Tatlı İ. İ; Akdemir. Z S.; ***Antimicrobial and Antimalarial Activities of Secondary Metabolites from Some Turkish Verbascum Species*** ; Pharm. Sci.; **2005**; No.30: p84-92.
- [23]Alaoui Alaoui K. , Lagorce J.F.,Cherrah, Y.; Hassar M., Amarouch H., Roquebert J. ; ***Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'Argania spinosa = Analgesic and antiinflammatory activity of Argania spinosa saponins*** ; Annales pharmaceutiques françaises ; **1998**; V 56 ;N° 5 : p220-228.
- [24] Chenghua G; ***Studies on the expectorant, antitussive and antiasthmatic properties of asterosaponin extracted from Luidia quinaria***; African Journal of Biotechnology; **2009**;V 8; N°23: p6694-6696.
- [25] Hassane A. ; ***Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier***. Faculté des sciences Rabat ; thèse soutenue le 24 /04/**2010**.

- [26] Kambouche N. , Merah B. , Derdour A. , Bellahouel S. , Benziane M. M. , Younos C. , Firkioui M. , Bedouhene S. , Soulimani R. ; *Étude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'Anabasis articulata (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie*; Phytothérapie; **2011**; V 9 N°1 : p2-6.
- [27] Yong-Jae K; *Synthetic Studies of Complex Immunostimulants from Quillaja saponaria: Synthesis of the Potent Clinical Immunoadjuvant; QS-21Aapi*. U.S. National Library of Medicine (PMC) ; **2009**; V36 N°128.
- [28] Ghedira K ; *Les flavonoïdes : structure, propriété biologique, rôle prophylactique et emploi en thérapeutique phytothérapie*; Springer ; **2005** ; N 4 : 162-169.
- [29] Milan H. ; *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques*; Pharmaco chimie; université Louis Pasteur STRASBOURG I ; thèse Soutenue le 28 juin **2004**.
- [30] Martinez A M ; *Flavonoïds* ; University Medellín; séance Septembre ; **2005**.
- [31] Isorez G. ; *Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouge* ; Université Louis Pasteur – STRASBOURG I ; thèse soutenue le 13 décembre 2007.
- [32] Winkly-Shirly B. ; *biosynthesis of flavonoids and effects of stress* ; current opinion in plant biology ; Elsevier ; **2002** ; V5 : pp.218-223.
- [33] Mark S., Meskin, Bidlack W. R., Randolph R. K. ; *Phytochemicals Aging and Health*; CRC Press; **2008**: p40.
- [34] Andersen Ø. M., Markham K. R.; *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*; édition **2006**: p750.
- [35] Cheblil L. ; *Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle* ; thèse soutenue **2006**.
- [36] Mompon B. , Lemaire B., Mengal P., Surbled M. ; *Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle*; Colloques de l'INRA ; **1996** ; V87 : 31-43.
- [37] Markham K.; *Techniques of flavonoid identification*; Academic Press; édition **1982**: p 12-30.
- [38] Mabry T.J. ,Markham K.R. Thomas M.B. ; *The systematic identification of flavonoids*; Springer-Verlag; New York; Heidelberg ;**1970**: p 25.
- [39] Macias F. A., Oliva R. M., Torres A.; MOLINILLO J. M. G.; *Allelochemicals from sunflower leaves cv*; Peredovick; Phytochemistry; **1999**: p613–621.
- [40] Macheix J.J.,Fleuriet A.,Billot J. ; *Fruit phenolics* ; CRC Press. Boca Raton ; **1990**: p378.

- [41] Macheix J.J.,Fleuriet A., Jay-Allemand C. ; *Les composés phénoliques des végétaux*; Presses Polytechniques et universitaires romandes ; Lausanne ; **2005** : p.131.
- [42] Macheix J.J.,Fleuriet A., Jay-Allemand C. ; *Les composés phénoliques des végétaux*; Presses Polytechniques et universitaires romandes ; Lausanne ; **2005** : pp.122-123.
- [43] Kandil F. E. , Grace M. H. ; *Polyphenols from Cornulaca monacantha Phytochemistry*; **2001**:p58-613.
- [44] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.; *Antioxidant properties of phenolic compounds*; Elsevier **1997**; V 2(4): p152-159.
- [45] López-Lázaro M.; *distribution and biological activities of the flavonoid luteolin*; department of pharmacology; Spain, mini reviews in medicinal chemistry; **2009**; V 9: p31-59.
- [46] Bylka W., Matlawska I., Pilewski N.A., *Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents*; the Journal of the American Nutraceutical Association (JANA); **2004**; V7 N° 2.
- [47] Kebièche M. , Lakroun Z. , Mraïhi Z. , R. Soulimani; *Effet antidiabétoène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de Ranunculus repens L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique* ; Phytothérapie Springer-Verlag France **2011**.
- [48] Chast F ; *Flavonoïdes alimentaires et santé humaine, particulièrement dans le domaine cardiovasculaire, Séance thématique* ; Paris Mercredi 27 janvier 2010 à 14 h 00.
- [49] Marca A ; *radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsines* ; Université de LIMOGES. 12 Décembre **2003**.
- [50] Yoshida K; *molecular targets of flavonoids during apoptosis in cancer cells*; Nova Science Publishers; **2009**.
- [51] Odontuya G., Hoult J.R., Houghton P.J.; *Structure- Activity Relationship for Anti-inflammatory Effect of luteolin and its Derived Glycosides*; Phototherapy research; **2005**; V19: p782-786.

Chapitre III

Méthodes de séparation et d'analyse

III-1-Les méthodes de séparation

III-1-1-La chromatographie :

Introduction :

La chromatographie est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange et pour purifier les substances. Bien que cette technique ait été développée à l'origine pour séparer des substances colorées (d'où le nom chroma (grec signifie couleur)) mais aujourd'hui la chromatographie est utilisée pour séparer toute substances même incolores. il faut donc employer une technique de révélation pour observer les couleurs (réactif complémentaire, UV) ^[1].

III-1-1-1-La chromatographie sur colonne (CC) :

La chromatographie sur colonne est une méthode importante. Cette technique sert également à séparer des produits organiques d'un mélange. Le type de chromatographie le plus moderne est celui avec le gel de silice. Les diverses substances introduites au sommet de la colonne de gel de silice sont plus ou moins retenues à la surface du support (appelée phase stationnaire), suivant leur polarité ^[2]. Elles sont donc plus ou moins facilement entraînées par des volumes déterminés et égaux de solvants (éluant) purs ou en mélange qui migrent dans la colonne. Les solutions de même volume sont recueillies séparément. Les éluants renferment le composé élué à l'état dissous. Toutes ces fractions sont évaporées à sec, et pesées ^[3].

III-1-1-2-Chromatographie sur couche mince (TLC) :

Une plaque de chromatographie sur couche mince (TLC, CCM en français) se compose d'un support, en aluminium ou en verre, sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu désorption (ex. la silice) comme phase stationnaire. Ces plaques sont plongées dans une phase mobile (éluant). Cette dernière est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherché. Les composés déposés à environ 1 cm du bas de la plaque sont alors humectés et dissous par la phase mobile qui progresse par capillarité le long de la phase stationnaire ^[4].

III-1-1-3-Chromatographie sur papier (CP) :

Probablement c'est la technique la plus utilisée dans la séparation des flavonoïdes soit en seule dimension, soit en deux dimensions.

Technique générale: le papier recommandé est celui de wattmans environ (46x57cm):

- D'abord la feuille du papier est pliée d'une façon déterminée afin du bien être fixée dans la cuve.
- l'extrait ou la fraction visée à séparer doit être bien concentré et déposée sur le papier. Après le séchage des taches d'extrait la feuille est mise dans la cuve avec une quantité de solvant (les solvants les plus utilisés sont l'acide acétique/ H₂O avec différentes concentrations 10%, 15%, 30% et une combinaison des solvants appelé BAW (n-BuOH/ acide acétique/ H₂O). La chromatographie se fait d'une façon descendante pendant plusieurs heures selon l'éluant utilisé (pour le mélange appelé forestal (AcOH/ H₂O) environ 8h)^[5].

III-1-1-4-Filtration sur gel :

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation des constituants en mélange en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure spatiale. La colonne est remplie d'un gel constitué de billes de polymère (ex. sephdex LH20). Cette technique a été initialement développée pour des séparations en chimie des polymères et le principe en était simple : plus la molécule est grosse et plus elle est éluée rapidement (elle « tombe » à travers le gel), plus elle est petite et plus elle sera ralentie par l'entrelacs des fibres de la phase stationnaire. Ici, la phase mobile ne joue donc que le rôle de véhicule .Le mélange à séparer est introduit par voie liquide et l'élution est assez rapide sans pression extérieure^[4].

III-1-1-5-Hydrolyse acide des hétérosides :

L'hydrolyse acide étant une opération très simple et elle est utilisée dans le cas des *O*-hétérosides.

Une fois la liaison osidique coupée, l'aglycone ainsi que le sucre détaché peuvent être analysés séparément. L'identification du sucre se fait par Co-chromatographie avec des solutions authentique.

- L'extrait pur est chauffé en présence d'acide chlorhydrique (2N) dans un bain marie pendant 30 à 120 minutes selon le degré de substitution de l'aglycone.

- Après refroidissement, l'aglycone est récupéré par affrontement à l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle ou le n-butanol selon la nature de cette dernière.

- L'identification de l'aglycone se fait par analyse spectrophotométrique UV visible et par Co-chromatographie en présence des substances témoins.

- La phase aqueuse résiduelle est évaporée à sec et reprise par une goutte d'eau pour l'identification des sucres pour cela :

- Une CCM en présence des sucres témoins s'effectue sur une plaque de gel de silice imprégnée d'une solution de NaH_2PO_4 (0,2M), l'élution se fait dans le mélange acétone/eau (9 :1).
- La révélation des sucres se fait par pulvérisation d'une solution de malonate d'aniline.
- les taches apparaissent brunes dans le visible et jaunes sous UV-Visible qu'on comparera (valeurs des R_f) avec celles des sucres témoins ^[6].

III-2-Méthodes d'analyse physico-chimique utilisées

III-2-1-Spectrophotométrie UV-visible :

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm - 1 400 nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électronique (s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide. Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde. Le spectre est le plus souvent présenté comme une courbe de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. ^[5].

III-2-2-Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est la technique la plus couramment utilisée pour mesurer la masse de molécules (en général des molécules organiques, y compris des biomolécules). Cette technique peut aider à caractériser les molécules particulière ou pour identifier une molécule inconnue, elle peut aussi donner des informations sur sa structure ^[7]. Deux techniques d'ionisation sont utilisées ^[8]:

- **L'impact d'électrons (EI)**: est une technique relativement rigoureuse et comporte un échantillon bombardé par un flux d'électrons afin de provoquer l'ionisation de l'échantillon sous une différence potentielle de 70 eV. Le résultat de cet effet est des fragmentations (chargé positivement, radicalaire, neutre).

- **Ionisation chimique (IC) :**

Elle est également liée à l'impact d'électrons, mais dans ce cas l'échantillon est ionisé par un gaz réactif. Plusieurs techniques applicables sont connues:

- MALDI (matrix assisted laser désorption ionization)
- FAB (Fast atom bombardment)
- ESI (Electro spray ionization)

III-2-3-Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire :

La RMN est utilisée pour étudier les propriétés moléculaires de la matière ^[9]. Cette technique spectroscopique repose sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Lorsque ces noyaux sont placés dans un champ magnétique fort, certains d'entre eux (qui ont le spin 1/2 comme H¹, C¹³, N¹⁵, P³¹) résonnent à une fréquence caractéristique dans la gamme de la fréquence radio du spectre électromagnétique ^[10]. Les noyaux émettent un signal magnétique appelé FID (free induction decay: décroissance d'induction libre) qui sera détecté électroniquement et capturé numériquement. Les FIDs numérisés sont traités par des méthodes de calcul (transformé de Fourier) ^[11]. En phytochimie, les atomes les plus étudiés sont l'hydrogène H¹ et le carbone C¹³.

Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées:

III-2-3-1-RMN du H¹ :

La détection de la résonance de l'atome d'hydrogène H¹ est possible depuis que cet isotope a un spin magnétiquement actif 1/2 avec une grande abondance naturelle et une présence dans la plupart des composés organiques ^[12]. Le spectre RMNH¹ est très important dans la détermination de structure chimique, il comporte trois informations importantes:

Le déplacement chimique (δ) : c'est une quantité sans unité qui interprète la résistance du nuage d'électrons au champ magnétique appliqué. En fait le déplacement chimique est quantifié en parties par million ppm ^[13] (qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil).

- **L'intégration :** L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. La prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule ^[14].
- **Le couplage :** les règles de couplage spin-spin sont importantes pour déterminer le nombre de lignes dans les multiplets et leur intensité. La constante de couplage (J) est mesurée en Hz et calculée en relation de déplacement chimique ou directement selon l'appareil utilisé ^[14].

III-2-3-2-RMN du carbone 13 :

C'est le même principe de la RMN H^1 mais la difficulté repose sur la faible abondance naturelle de carbone 13 (1,108%), une raison que la sensibilité du carbone (1,59%) est très basse par rapport à celle du proton (100%)^[15]. Plusieurs expériences permettent au moyen de séquences d'impulsions particulières de conserver une partie des informations qu'aurait apporté le couplage $H^1 - C^{13}$, tout en bénéficiant du gain de sensibilité procuré par le découplage:

1. Expérience DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) :

C'est la méthode la plus utilisée pour déterminer la multiplicité des pics. L'expérience nécessite une série d'impulsions programmées à la fois, donnant ainsi un spectre qui ne contient que des signaux de CH_3 , CH_2 , CH découplés^[16].

2. Expérience ATP (Attached Proton Test):

Appelée aussi expérience J mod, est une expérience simple pour attribuer les multiplicités dans la spectroscopie C^{13} . Dans cette expérience les signaux de CH , CH_3 apparaissent comme des pics positifs tandis que ceux de CH_2 et C quaternaires sont négatifs.^[13]

III-2-3-3-RMN bidimensionnelle :

La diffusion des pics spectraux sur la deuxième dimension permet de simplifier la visualisation des spectres complexes qui constituent un grand nombre de chevauchement des pics^[17]. Cette technique permet la visualisation, sous forme des corrélations existantes entre les différents signaux, qu'elles appartiennent. Des tâches, qui sont en fait une vue « de dessus » dites tâches de corrélation ou pics de corrélation, matérialisent l'existence d'un lien quelconque entre deux atomes^[14].

Plusieurs expériences sont utilisées^[18]:

- **COSY (COrrrelation SpectroscopY)** : c'est la visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). L'intérêt n'est pas énorme par rapport au spectre de proton simple, mais il apporte un gain certain de clarté et permet de distinguer différents signaux dans un massif pour les attribuer précisément.
- **TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)** : indique en plus des voisins immédiats les voisins plus éloignés ce qui permet de reconstituer plus facilement l'enchaînement des protons sur le squelette carboné.

- **ROESY (Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)** : met en évidence les interactions dipolaires de deux atomes d'hydrogène. C'est donc une technique intéressante en termes de stéréochimie.
- **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)** : indique quel proton est directement lié à quel carbone.
- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)** : montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situés à plusieurs liaisons de distance (typiquement trois). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

Références bibliographiques

- [1] Kasakevich Y., Lobrutto R.; *HPLC for pharmaceutical scientists*, édition Wiley; 2007; p.4.
- [2] Gramegna Morchio A.; *Chromatographie Purification d'un produit organique à l'aide d'une colonne chromatographique*; Biochimie; 2004; p.2.
- [3] Colin- Poole F.; *the Essence of Chromatography*; Elsevier 2003; pp.3-4.
- [4] Alkhatib R.; *Étude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de Ferula elaeochytris Korovin et Ferula lycia Boiss. Apiacées*; université Lille nord de France; 2010; pp.128-135.
- [5].Skoog E.T, Holler F.J., Crouch S.R. ; *Principles of Instrumental Analysis*; 6th Ed Brooks/cole; 2007; pp.169-173.
- [6] Markham K.; *Techniques of flavonoid identification*; Academic Press; 1982: p.83.
- [7] Tranter G., Holmes J. L., Lindon J.C. ; *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, imperial College of Science; Technology and Medicine London; 1999; pp.18-24.
- [8] Anderson R.J., Bendell D.J., Groundwater P.W.; *Organic spectroscopic analysis*; The Royal Society of Chemistry; 2004; pp.120-124.
- [9] Blümich B.; *Essential NMR Essential NMR for Scientists and Engineers* Springer; 2005; p.1.
- [10] Jacobsen N.E.; *NMR spectroscopy explained Simplified Theory Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*;ed Wiley; 2007; pp.1-30.
- [11] Simpson J.H.; *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*; 2008; pp.13-83.
- [12] Raymond J.A., Mobli M.; *Modeling 1H NMR Spectra of Organic Compounds Theory Applications and NMR Prediction Software*; ed Wiley ; 2008; pp.2-315.
- [13] Anderson R.J., Bendell D.J., Groundwater P.W.; *Organic spectroscopic analysis*; The Royal Society of Chemistry; 2004; p.57.
- [14] Terence N.M., Burkhard C.; *NMR – from Spectra to Structures an Experimental Approach*; ed Springer; 2004; p.53.
- [15] Breitmaier E., Veolter W.; *Carbone -13 NMR spectroscopy high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*, VCH, New York ;1990, pp.21-23.
- [16] Field L.D., Ternhell S. J.S., Kalman R.; *Organic Structures from Spectra*; 2008; pp.65-66.
- [17] Noda I., Ozaki Y.; *Two-dimensional Correlation Spectroscopy – Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy*; 2004; p.26.
- [18] Lambert J.B., Mazzola E.P.; *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy –An Introduction To Principles, Applications And Experimental Methods*; ed Prentice Hall ; 2003; p.18.

Chapitre IV
Étude bibliographique
et phytochimique
du Verbascum
atlanticum

IV-1- Étude bibliographique de *Verbascum atlanticum*

Introduction

Le *Verbascum atlanticum* est connu sous autres noms *Verbascum repandum* batt non Willd^[1] et *Verbascum pseudoblataria*. C'est une plante bisannuelle décrit pour la première fois en 1890 par Battendier. J. A dans la flore de l'Algérie^[2].

IV-1-1-Classification botanique : la classification de *Verbascum atlanticum* dans la systématique est représentée dans le tableau 7.

Tableau N°7 : systématique de *Verbascum atlanticum*^[3] :

• Domaine : <i>Eukaryota</i>
• Règne : <i>Plantae</i>
• Sous-règne: <i>Viridiaeplantae</i>
• Embranchement : <i>Magnoliophyta</i>
• Sous-embranchement : <i>Euphyllophytina</i>
• Classe : <i>Magnoliopsida</i>
• Sous-classe : <i>Lamiidae</i>
• Super-ordre: <i>Lamianae</i>
• Ordre : <i>Scrophulariales</i>
• Famille : <i>Scrophulariaceae</i>
• Genre: <i>Verbascum</i>
• Espèce : <i>atlanticum</i>
• Nom Botanique: - <i>Verbascum atlanticum</i>

IV-1-2-Description botanique

L'espèce *Verbascum atlanticum*. Batt a des étamines antérieures courbées en demi-cercle vers le haut, à anthères oblongues. Étamines médiane ayant tendance à l'avortement et souvent rudimentaire ou même absente. Style \pm incurvé dans le haut, épaissi au milieu et atténué au sommet. Pédicelles fructifères épais, à peine plus longs, rameux-dendroïdes ou subverticillés. Feuilles basilaires distinctement pétiolées, à pétiole non ailé, limbe généralement pinnati partite \pm lyré, à segments libres^[4] (figure 21).

IV-1-3-Répartition géographique :

Verbascum atlanticum est répandu dans les montagnes d'Algérie et du Maroc^[4]. L'espèce est très répandue à l'est algérien, au sein de la région de récolte (Elgrarem willaya de Mila).

IV-2-Étude phytochimique de *Verbascum atlanticum*

IV-2-1-Récolte de matière végétale :

La matière végétale a été collectée en juin 2010 près de la région Elgrarem, wilaya de Mila. Le séchage est effectué à l'abri de lumière et d'humidité.



Fig.21 : *Verbascum atlanticum*

IV-2-2- Le criblage phytochimique de *Verbascum atlanticum* (screening) :

Introduction :

Le screening d'une plante sert à caractériser les groupes chimiques contenus dans cette plante afin d'expliquer ces effets thérapeutiques ^[5]. Le *Verbascum atlanticum* semble n'avoir jamais été étudiée chimiquement contrairement à d'autres espèces du genre. Nous avons entrepris un screening phytochimique de *Verbascum atlanticum* afin de connaître ses principaux constituants et ainsi mieux comprendre les propriétés biologiques de ses extraits.

Le screening s'est fait sur les feuilles et les fleurs de la plante et avec divers réactifs. Les résultats sont classés selon :

- Réaction positive : +
- Réaction négative : -

Matériel végétal : les fleurs et feuilles de *Verbascum atlanticum* séchées sont réduites en poudre au mortier traditionnel. Le protocole réalisé lors de ce screening est le suivant :

IV-2-2- 1-Recherche des alcaloïdes ^[6] :

Produits utilisés :

- Poudre végétale.....5g ;
- Acide sulfurique dilué à 10%...25ml ;
- Réactif de Dragen dorff.

Solution à analyser : Nous avons :

- dissout 5g de poudre végétal dans 25ml d'acide sulfurique dilué à 10% dans un Erlen Meyer .
- laissé macérer pendant 24 heures ;
- filtré et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 25ml du filtrat ;
- introduit 1ml du filtrat dans un tube à essai ;
- ajouté 3 gouttes du réactif de Dragen Dorff.

Caractérisation :

Réaction de précipitation : l'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes.

IV-2-2- 2- Recherche des coumarines ^[7] :

Produits utilisés :

- Poudre végétale.....1g ;
- Éther diéthylique20ml ;
- Ammoniaque à 25% ;
- Eau distillée 2ml.
- **Solution à analyser ;** Nous avons :
- Mis 1g de poudre végétale dans un Erlen Mayer;
- Ajouté 20ml de l'éther di éthylique à la poudre avec agitation ;
- Laissé macérer pendant 24heures ;
- Filtré et complété le filtrat jusqu'à 20ml ;
- Évaporé l'extrait éthéré à l'air libre jusqu'à 5ml ;
- Repris avec 2ml de l'eau chaude;
- Partagé la solution entre deux tubes à essai ;
- Ajouté au contenu de l'un des tubes de l'ammoniaque à 25% ; mélange et observé la fluorescence sous UV à 366nm.

Caractérisation :

Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

IV-2-2- 3- Recherche des triterpènes, stérols et terpènes :

Produits utilisés :

- Poudre végétale.....5g ;
- Solution de méthanol/eau (v/v 80 :20) ;
- Méthanol.....50ml ;
- Éther di éthylique20ml ;
- Chloroforme ;
- Anhydre d'acétique ;
- Acide sulfurique concentré.

Solution à analyser : nous avons :

- Laisse macérer 5g de matière végétale dans 50ml de Solution de méthanol/eau (v/v 80 :20) pendant 24heures et filtré ;
- Évaporé l'extrait hydro alcoolique à sec ;
- Ajouté 20ml de l'éther di éthylique après refroidissement afin de dissoudre les composés apolaires.

IV-2-2- 3-1- Identification des terpènes et stérols ^[8] :

La phase étherée obtenue est évaporée à sec, puis reprise par 15 ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est divisés en 3parties :

- La première partie : laissée comme témoin
- La deuxième partie : à cette solution on a rajouté 3ml d'anhydre acétique et 3gouttes d'acide sulfurique concentré.

Caractérisation :

Un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés, cette couleur devenue vert foncé montre la présence des terpènes

- La troisième partie : a cette partie on ajouté quelques gouttes d'acide sulfurique.

Caractérisation :

L'apparition d'une couleur rouge cerise montre la présence des stérols insaturés.

IV-2-2- 3-2- Identification des triterpènes ^[9] :

Un volume de 10 ml d'extrait hydro alcoolique est évaporé à sec, le résidu obtenu est dissous dans 0,5ml d'anhydre acétique et 0,5ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec avec une pipette pasteur on rajoute (1-2 ml) d'acide sulfurique concentré au fond du tube.

Caractérisation :

Au contact des deux phases organiques la formation d'un anneau marron montre la présence des triterpènes.

IV-2-2- 4-Recherche des substances poly phénoliques (tanins) :

Produits utilisés :

- Matière végétale.....5g ;
- FeCl₃ (1%).....quelques gouttes ;
- Acétate de sodium.....suffisamment pour saturation ;
- Eau distillé.

Solution à analyser : 5g de matière végétale sont infusés dans 50ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes.

IV-2-2- 4-1-Tanins catéchiqes ^[10] :

2ml de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%).

Caractérisation :

L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiqes.

IV-2-2- 4-2-Tanins galliques ^[9] :

2ml de l'infusé précédent sont prélevés est mis dans un tube à essai, saturé en acétate de sodium puis on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%).

Caractérisation :

La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

IV-2-2- 5-Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes ^[11] :

Produits utilisés :

- Matière végétale.....5g ;
- Eau distillée ;
- NaOH (1N) ;
- HCl concentré ;
- Coupeaux de magnésium.

Solution à analyser :

- 5g de matière végétale sont infusés dans 50ml d'eau distillée pendant quelques minutes ;
- Après filtration on introduit 6ml du filtrat dans 3 tubes chacun contient 2ml on ajoute dans :

- 1^{er} tube : 1ml de NaOH ;
- 2^{eme} tube : 1 ml d'eau distillée ;
- 3^{eme} tube : 1ml de HCl concentré et des copeaux de magnésium.

Caractérisation :

En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.

La coloration rouge au 3^{eme} tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

IV-2-2- 6-Recherche des saponines ^[12] :

Produits utilisés :

- Matière végétale.....5g ;
- Eau distillée.

Solution à analyser ; Nous avons :

- mis dans un Erlen mayer une quantité de l'infusé utilisé dans la recherche des flavonoïdes ;
- agité pendant quelques minutes.

Caractérisation :

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

IV-2-2- 7- Recherche des anthocyanes ^[13] :

Produits utilisés :

- Matière végétale.....5g ;
- Ammoniaque à 10%...5ml ;
- Acide sulfurique dilué à 10%...5ml ;
- Eau distillée.

Solution à analyser : On a

- laissé 5g de matière végétale dans 50ml d'eau distillée bouillante pendant 15mn ;
- filtré et complété avec l'eau jusqu'à 50ml ;
- pris et y ajouté 5ml d'acide sulfurique dilué à 10% et 5ml d'ammoniaque à 10%.

Caractérisation :

La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

IV-2-2- 8- Recherche des quinones ^[14] :

Produits utilisés :

- Matière végétale.....5g ;
- HCl quelques gouttes ;
- Éther de pétrole...10ml ;
- NaOH10% ...2ml.

Solution à analyser : Nous avons

- Humecté 5g de matière végétale par quelques gouttes de HCl ;
- Mit cette matière en macération dans un Erlen contenant 10ml d'éther de pétrole pendant 24 heures ;
- Filtré et pris 2ml du filtrat dans un tube à essai ;
- Ajouté 2ml de NaOH 10% au filtrat.

Caractérisation : la coloration rouge –violet indique la présence des quinones.

IV-2-3-Préparation des extraits bruts :

Une quantité de 957g des parties aériennes de la plante (feuilles et fleurs) séchées et broyées au mortier traditionnel sont mises en macération dans un mélange hydro alcoolique (méthanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 72 heures puis 3fois pendant 48h à température ambiante. Les filtrats obtenus chaque fois sont réunis et concentrés sous vide à 35°C.

Remarque : lors de la concentration on remarque la formation d'une mousse persistante et intense surtout à basse pression.

Après concentration presque à sec l'extrait brut est pesé, on a ajouté 430ml d'eau distillée, La solution ainsi obtenue est laissée au repos pendant une nuit. Après filtration on a obtenu une solution aqueuse d'une couleur marron- verte.

IV-2-3-1-Extraction : le filtrat de l'extrait brut est transphasé dans une ampoule pour une extraction liquide-liquide par des solvants de polarité croissante :

a) Extraction par l'éther de pétrole:

Après addition d'un volume de 2/3 éther de pétrole de volume du filtrat et agitation, il y a formation d'une mousse et pas de séparation de phases. Le mélange est laissé une nuit mais aucune phase n'est formée, juste une couche huileuse avec une mousse persistante et intense. Après plusieurs tentatives le mélange est laissé à l'air libre afin d'évaporer l'éther de pétrole.

Résultats : pas de phase d'éther de pétrole.



Fig.22 : L'extraction avec l'éther de pétrole

b) Extraction par le chloroforme et dichlorométhane: après évaporation de l'éther de pétrole un petit de l'extrait volume est mis dans deux tube à essai où on a ajouté dans le premier, le CHCl_3 et dans le second le CH_2Cl_2 .

Résultats : une grande émulsion comme une crème (figure 23,24).



Fig.23 : extraction avec chloroforme



Fig.24 : extraction avec dichlorométhane

c) Extraction par Acétate d'éthyle: le processus se déroule d'une façon normale et après concentration on a obtenu 11,91g d'extrait acétate d'éthyle.

d) Extraction par *n*-butanol: le processus se fait d'une façon normale et après concentration on a obtenu 167,28g d'extrait *n*-butanol.

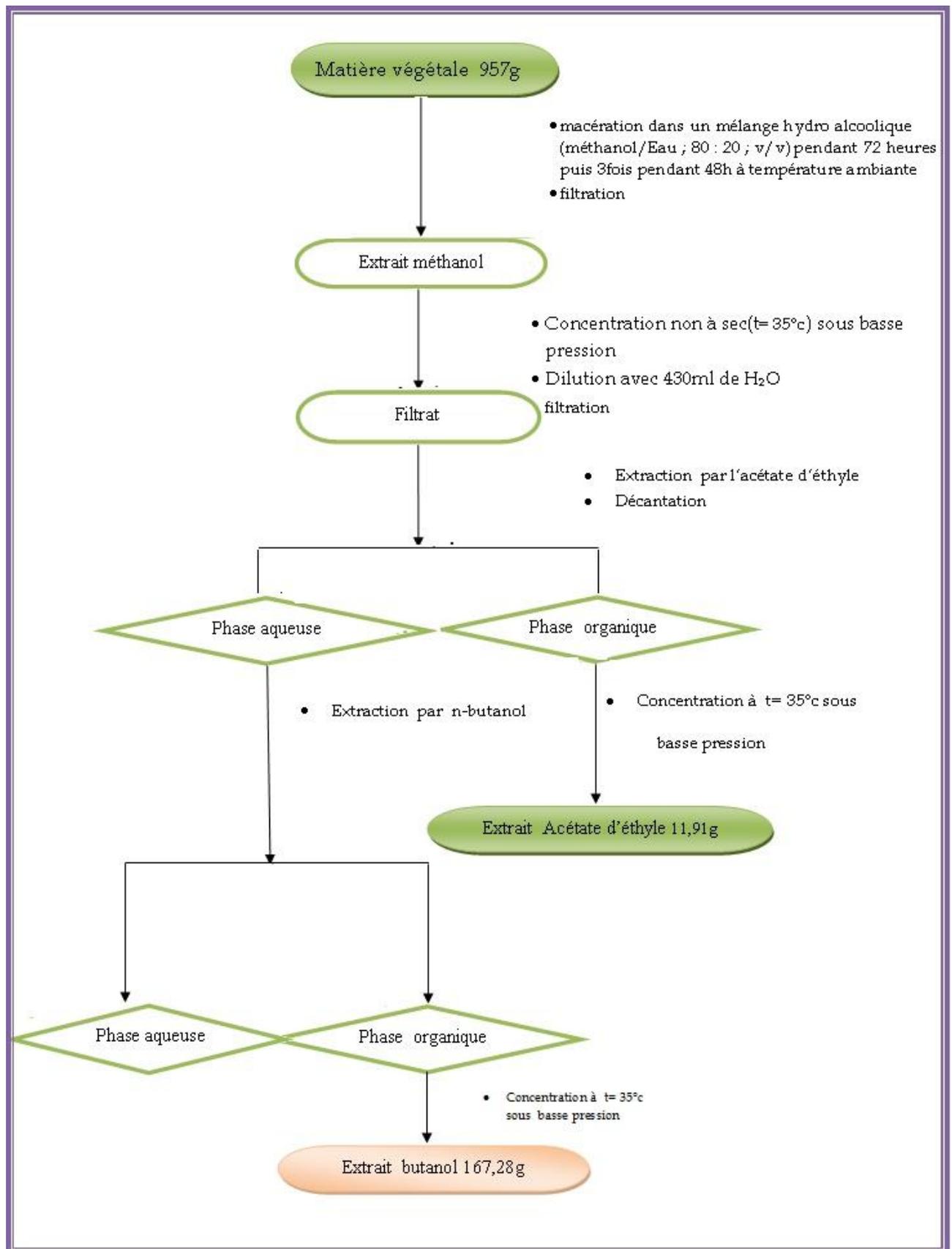


Fig.25 organigramme d'extraction

IV-2-3-2- Rendement des extraits :

le tableau 8 représente les résultats des rendements des extraits :

Tableau N°8 : Rendement des extraits :

Matière végétale	extrait	masse	rendement
957g	Acétate d'éthyle	11,91g	1,25%
	n-butanol	167,28g	17,48%

IV-2-3-3-Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Avant d'entamer le fractionnement de l'extrait *n*-butanol on a procédé à une série des tests chromatographiques, sur couche mince de gel de silice par plusieurs éluants afin d'obtenir le meilleur système d'élutions.

La meilleure séparation est réalisé avec le système : CH₂Cl₂/MeOH (88 /12).

Une quantité de 10,54g d'extrait *n*-butanol dissoute dans le méthanol et séchée par le gel de silice sous pression puis a soumis une séparation, en utilisant une colonne de 2cm de diamètre, d'une hauteur de 120 cm et 316g de gel de silice préparé dans le CH₂Cl₂.

L'élution se fait avec un gradient de MeOH dans le CH₂Cl₂ jusqu'à l'épuisement de l'extrait et a permis de donner 716 lots de 50ml rassemblés en 25 fractions sous le contrôle des plaques CCM dans différents système d'élution et la lumière UV (254 et 366 nm). Le regroupement des fractions est représenté dans le tableau suivant :

Tableau N°9 : Fractionnement de l'extrait n-butanol :

Nombre des lots (50ml)	Nom de la fraction	Masse de fraction en mg	Système d'élution %	
			dichloromethane	méthanol
1 → 27	F1	17,2	100	0
28 → 84	F2	17,5	100	0
85 → 108	F3	19,89	98	2
109 → 122	F4	25,6	97,5	2,5
123 → 130	F5	28,6	95	5
131 → 180	F6	95,6	95	5
181 → 194	F7	90,8	92	8
195 → 232	F8	446,9	88	12
233 → 259	F9	420,3	92	16
260 → 307	F10	2004,8	80	20
308 → 354	F11	1326,1	75	25
355 → 407	F12	639,2	70	30
408 → 451	F13	576,2	65	35
452 → 506	F14	426	60	40
507 → 528	F15	293,6	55	45
529 → 544	F16	243,5	50	50
545 → 568	F17	176	45	55
569 → 606	F18	289,62	40	60
607 → 626	F19	294	34	65
627 → 636	F20	194,2	30	70
637 → 656	F21	235,2	20	80
657 → 668	F22	278,9	10	90
669 → 684	F23	190	0	100
685 → 700	F24	91,4	0	100
701 → 716	F25	476,3	0	100

IV-2-3-4-Séparation et purification des fractions :**Traitement de F9 :**

Cette fraction a subit une séparation sur papier wattmans (43x44cm) élué par AcOH 15% pendant 8h. Cette séparation a permis de donner les résultats représentés dans le tableau suivant. De la fraction F9 on obtient le produit F9-4 qu'on doit commenter.

Tableau N°10 : l'ensemble des produits de F9 :

Nom de produits à partir de tache dépôt	Couleur sous lampe UV 366nm	Poids	observation
F9-1	Jaune orange	43mg	Mélange séparable
F9-2	Noir violet	32,1mg	Mélange séparable
F9-3	Jaune	32mg	Mélange séparable
F9-4	Noir violet	10mg	Monotache
F9-5	Noir violet	15mg	Mélange séparable
F9-6	Bleu	53mg	Mélange séparable
F9-7	Jaune vert	50mg	Mélange séparable

Traitement de F10 :

Cette fraction de 2g a subit une séparation sur colonne de gel de silice et éluée par le système isocratique CH₂Cl₂/ MeOH (6,1:3,2) et les sous fractions sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau N°11 : Fractionnement de F10 :

Nombre des lots (50ml)	Nom de la fraction	Masse de fraction en (mg)	Système d'élutio %	
			CH ₂ Cl ₂	MeOH
1 → 36	SF10-1	18	100	0
37 → 96	SF10-2	20	98	2
97 → 126	SF10-3	10	95	5
127 → 146	SF10-4	15,6	93	7
147 → 171	SF10-5	171,5	92	8
172 → 241	SF10-6	43,5	88	12
242 → 262	SF10-7	50,3	87	13
263 → 295	SF10-8	150	86	14
296 → 320	SF10-9	234	82	18
321 → 330	SF10-10	161,2	80	20
331 → 341	SF10-11	76,5	75	25
342 → 355	SF10-12	10,4	70	30
356 → 365	SF10-13	67	65	35
366 → 385	SF10-14	27,5	60	40
386 → 400	SF10-15	133	55	45
401 → 428	SF10-16	600	50	50
429 → 460	SF10-17	164,1	40	60
461 → 464	SF10-18	180	30	70
465 → 475	SF10-19	170	20	80
676 → 686	SF10-20	120,9	10	90
687 → 500	SF10-21	201,3	0	100

Parmi ces sous fractions obtenues, nous avons étudié trois sous fractions :

- SF10-8(150mg) : mélange séparable.
- SF10-16 (600mg) : mélange séparable.
- SF10-20(120.9mg) : mélange séparable.

Traitement de SF10-8:

Sur des plaques préparatives de gel de silice et éluee par le système AcOEt/ MeOH/ H₂O (8/1/1).

Cette séparation a permis d'obtenir les résultats suivants regroupés dans le tableau suivant :

Tableau N°12 : l'ensemble des produits de SF10-8 :

Produit	masse	Observation
SF10-8-1	10mg	mono tache (Absorption sous lumière UV 254nm)
SF10-8-2	32mg	Mélange séparable
SF10-8-3	28mg	Mélange séparable
SF10-8-4	37mg	Mélange séparable
SF10-8-5	15mg	Produit majoritaire avec quelques impuretés

Traitement de SF10-8-2 et SF10-8-3 :

Ces deux sous fractions ont subi purification sur plaques préparatives (CCM), en utilisant comme système éluant : CH₂Cl₂/Me/H₂O (4 /1 /0.1). Le tableau suivant montre les résultats :

Tableau N°13 : les produits de SF10-8-2 et SF10-8-3 :

Produit	masse	Observation
SF10-8-21	2,8mg	Monotache noir violet sur UV 366nm
SF10-8-3-1	5,45mg	Monotache jaune sur UV 366nm

Purification de SF10-8-5 :

Ce produit est soumis à une CCM pour le purifier en utilisant le système CH₃OH/MeOH/H₂O (4 /1 /0,1) comme éluant, le produit SF10-8-5 est alors obtenu à l'état pur.

Traitement de SF10-16 :

Les 600mg de cette fraction sont purifiés par une colonne de gel de silice élué par le système isocratique CH₂Cl₂/ MeOH/H₂O (4/1/0,1). Cette séparation a permis de donner 10 fractions provenues de 50 lots de 50ml. La fraction SF10-16-1 est sous forme de précipité blanc P. Les résultats de cette opération sont regroupés de le tableau 14.

Tableau N°14 : Fractionnement de SF10-16 :

Fraction	Masse
SF10-16-1	10 mg (P)
SF10-16-2	35mg
SF10-16-3	63mg
SF10-16-4	120 mg
SF10-16-5	55,3 mg
SF10-16-6	36mg
SF10-16-7	71,6mg
SF10-16-8	12mg
SF10-16-9	35,9mg
SF10-16-10	80mg

Traitement de SF10-20:

Le traitement de cette fraction se fait par le C.P. et a permis de donner le produit SF10-20-1 sous forme de mono tache de couleur noir violette sous la lumière de Wood.

Conclusion

Le traitement de l'extrait *n*-butanol a permis d'isoler sept produits, La figure 26 représente les fractions traitées ainsi que les produits séparés :

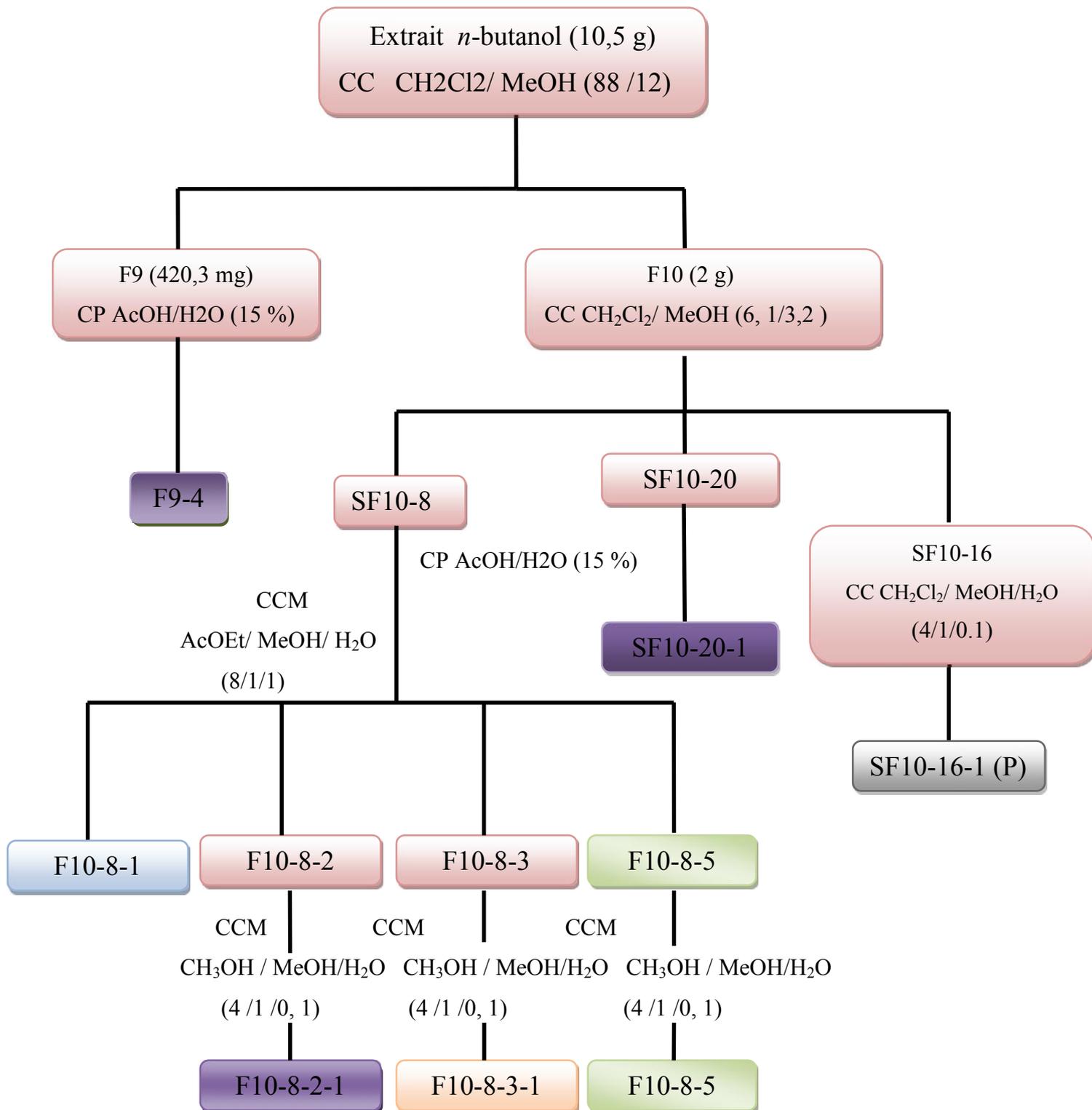


Fig.26 Organigramme représente les fractions traité et les produits séparés

Références bibliographiques:

- [1] J. Battandier A., Trabut T.; *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie* ; 1902 ; p.242.
- [2] *Bulletin de la Société botanique de France* ; 1890 ; V37 :198.
- [3] zipcodezoo ; *verbascum atlanticum* ; http://zipcodezoo.com/Plants/V/Verbascum_atlanticum/ consulté 08/08/2010.
- [4] Quezel F., Santa S.; *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Meridionales* ; 1963 ; p.830.
- [5] N'guessan K., B Kadja, G Zirih, D Traoré, L Aké-Assi ; *Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)* ; Sciences & Nature ; 2009 ; V 6 ; N°1 : 1 -15.
- [6] C.M.Hladik ; *rôle des produits secondaires (tanins et alcaloïdes des espèces forestières de l'est de Madagascar face à populations animales)* ; Diversity and Endemism in Madagascar ; 2000 ; p.107.
- [7] Koudougou K ; *Étude de la chimie et de l'activité antimycosique des extraits de Biophytum petersianum Klotzsch (Oxalidaceae)* ; université de Ouagadougou – DEA ; 2000 ; p.16.
- [8] Bekro Y. A., Mamyrbekova Bekro J. A., Boua B. B .1T rabi, F. H., Éhilé E. E. ; *Étude ethnobotanique et screening phytochimique de Caesalpinia benthiana (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae)* ; Sciences & Nature ; 2007 ; V4 ; N°2 : 220.
- [9] Mibindzou M.A.; *Screening phytochimique de deux espèces de plantes : Crotalaria retusa L (Papilionaceae) et Mitragyna ciliata Aubrev. & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon* ; 2004 ; p.62.
- [10] Kongo-Nzuzi Y.; *Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de candidas albicans* ;ISTM Kinshasa ; 2009 ; p.25.
- [11] Bouquet A.; *Plantes médicinales de Congo Brazzaville* ; Travaux et document O.R.S.T.O.M paris ; 1972 ; N°13 : p.9.
- [12] Lokadi L. P.; *Etude Chimique de l'espèce Jacobinia Carnea* ; Université de Lubumbashi 2008.
- [13] Dohou N., Yamini K.,Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N. ; *Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, thymelaea lythroides* ; Bull. Soc. Pharm. Bordeaux ; 2003 ; p.66.

[14] Najjaa H., Zouari S., Arnault I., Auger J., E. AmmarR., Neffati M., *Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre Allium, Allium roseum L. et Allium ampeloprasum L* ; Acta Bot. Gallica ; **2011** :V158 ; N°1 :111-123.

Chapitre V
Résultats et discussion

V-1-Résultats et interprétations de l'étude préliminaire sur *Verbascum atlanticum* (screening) : Le tableau ci dessous présente le résultat du screening réalisé sur *Verbascum atlanticum* :

Tableau N°15 : résultats de criblage (screening) phytochimique de *Verbascum atlanticum*

Recherche	Feuilles	Fleurs	Modèle de résultat (photo et coloration)
Alcaloïdes	±	±	Précipité marron
Coumarines	-	-	Pas de changement de fluorescence
Terpènes	++	++	 vert foncé
Stérols :			
• Saturés	++	++	 Rouge cerise
• Non saturés	++	++	 vert
Triterpènes	+++	+++	 anneau marron
Tanins cathéchiqes	+	+	Apparition d'un précipité vert
Tanins galliques	+	+	
Flavonoïdes	++	++	 Jaune  jaune
Leucoanthocyanes	±	±	 brun-rouge
Anthocyanes	-	-	 pas de réaction

Saponines	++++	++++	 mouse intense
Quinones	-	+	Coloration rouge faible

Conclusion et interpretation :

le criblage phytochimique montre que l'espèce *Verbascum atlanticum* batt. est tres riche par plusieurs classes de métabolites secondaires notamment les terpenes et les saponines.

Ces resultats renfocent les recheches bibliogaphique précédantes sur le genre *Verbascum* et la richesse de ses especes en terpenes et en saponines .

V-2- Détermination structurale des produits isolés de *verbascum atlanticum* :

V-2- 1- Identification du F9-4

La fluorescence noire violette du produit F9-4 sous la lumière UV (365nm), et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence de méthanol ($\lambda_{\max}=349 \text{ nm}$) sur le spectre UV (figure 27), sont caractéristiques d'une flavone ou flavonol (3-OH).

L'examen du spectre proton et son étalement (fig. 28 et 29) de ce composé montre la présence de :

Un singulet à $\delta=6,68\text{ppm}$ d'intégration 1H attribué à H-3, confirmant ainsi la flavone.

Deux doublets ($J=2,1\text{Hz}$) d'intégration 1H chacun à $\delta=6,56$ et $6,87\text{ppm}$, attribuable à H-6 et H-8 respectivement.

Un multiplet à $\delta=7,40\text{ppm}$ d'intégration 2H, caractéristique de H-2' et H-6'.

Un doublet ($J=9,7\text{Hz}$) à $\delta=6,94\text{ppm}$ d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

On a un signal à $\delta=5,31\text{ppm}$ partiellement recouvert qui peut être attribuable au proton anomérique du sucre.

Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3 à 4ppm attribuable par conséquent aux protons du sucre.

Le spectre UV (fig.27) montre un effet bathochrome ($\Delta\lambda=+51\text{nm}$) de la bande I après addition de NaOH indiquant ainsi la présence d'un OR à la position 4'.

L'absence d'une nouvelle bande entre 320-350nm est significative d'une substitution en position 7, ce-ci est confirmé par le faible déplacement ($\Delta\lambda_{II}=+2\text{nm}$) de la bande II en présence de NaOAc par rapport au spectre du méthanol.

La présence d'une seule bande à 420nm en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au méthanol indique la présence d'un OH en position 5.

Le spectre enregistré en présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ montre un effet hypsochrome ($\Delta\lambda_I = -42\text{nm}$) ce qui laisse prévoir la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B. Ce-ci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +21\text{nm}$) en comparant le spectre enregistré dans $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ avec celui enregistré dans le méthanol.

Les données relatives aux spectres RMN^1H et la série spectrale UV sont rassemblées dans les tableaux 16 et 17 respectivement.

Tableau N°16 : Les données spectrales de RMNH¹ du F9-4

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J(Hz)	Attribu à
5,31	1H	d	3,83	H anomérique
6 ,56	1H	d	2,1	H ₆
6,68	1H	s	/	H ₃
6,87	1H	d	2,1	H ₈
6,94	1H	d	9,70	H _{5'}
7,40	2H	Multiplet	–	H _{2'} et H _{6'}

Tableau N°17 : Résultat de la série spectrale UV visible pour F9-4

Réactif	Bande I (nm)	$\Delta\lambda$ (I) _{max}	Bande II (nm)	$\Delta\lambda$ (II) _{max}
MeOH	349		255	
NaOH	390	+41	264	
NaOH+5	390	+41	264	
AlCl ₃	426	+77	274-296	
AlCl ₃ + HCl	356-384	/MeOH : +35 / AlCl ₃ : -42	270-296	
NaOAc	359,412	+10	257	+2
NaOAc +H ₃ BO ₃	371	+22	260	

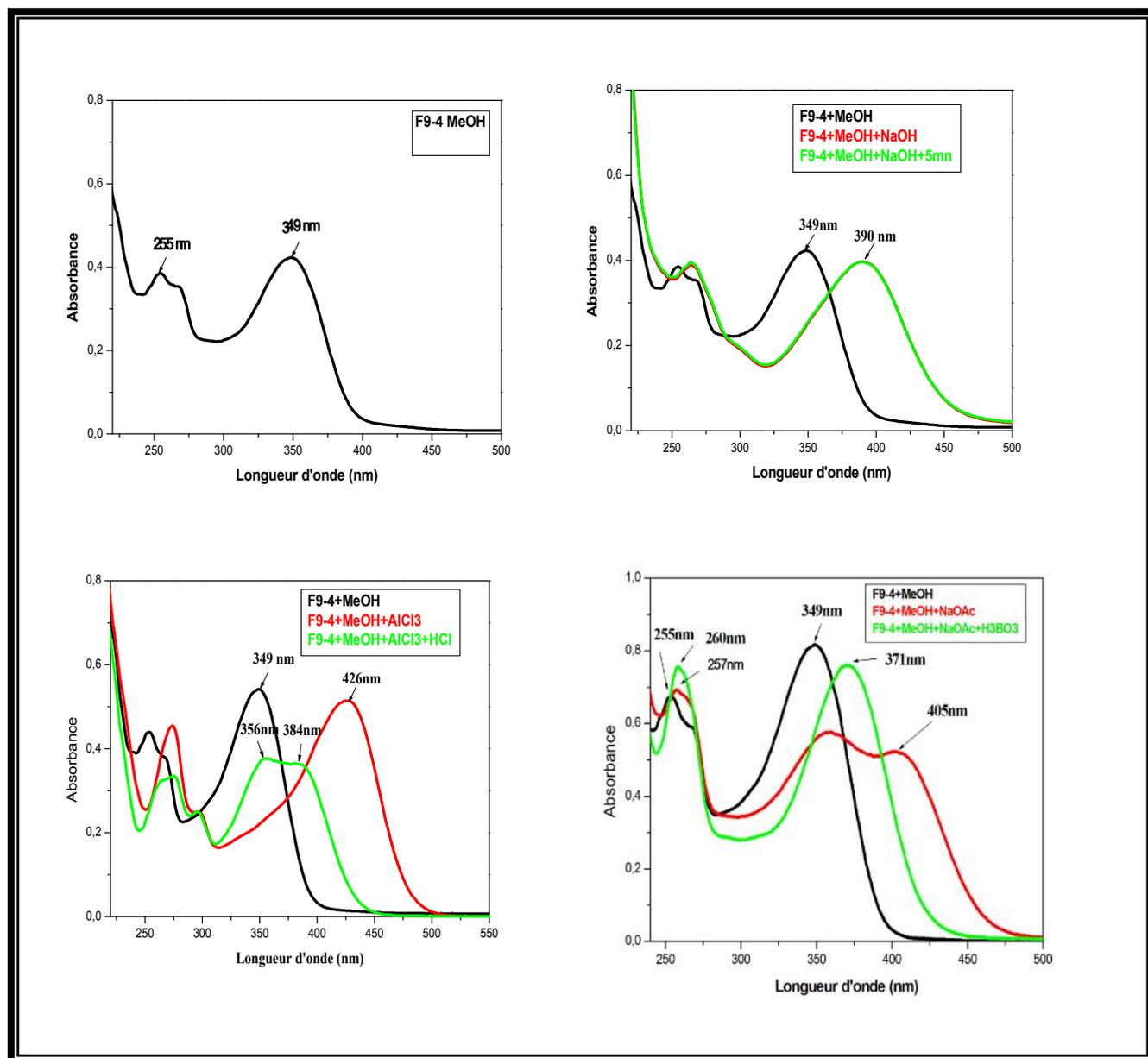
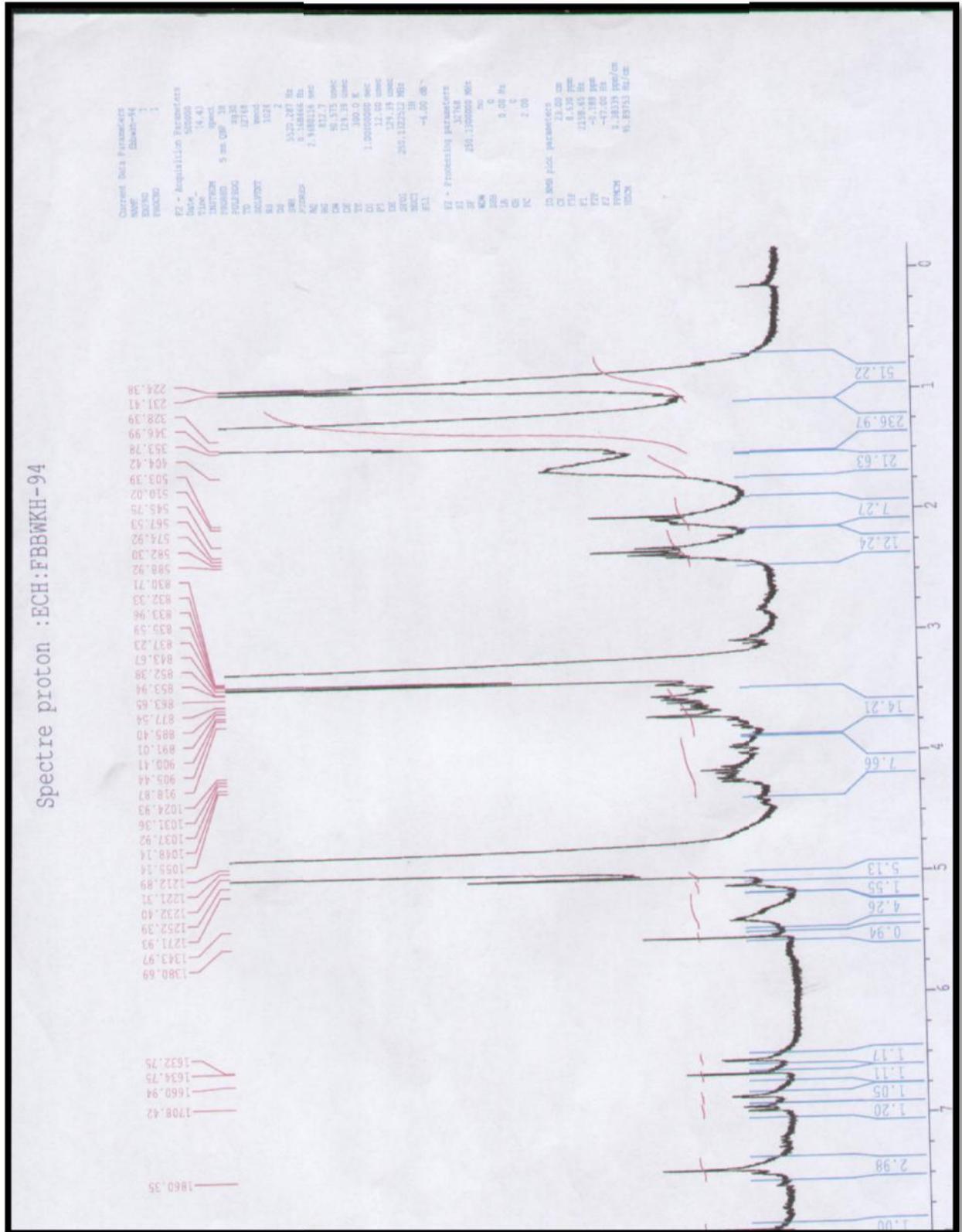


Fig. 27 : La série des courbes spectrales d'UV visible de F9-4.



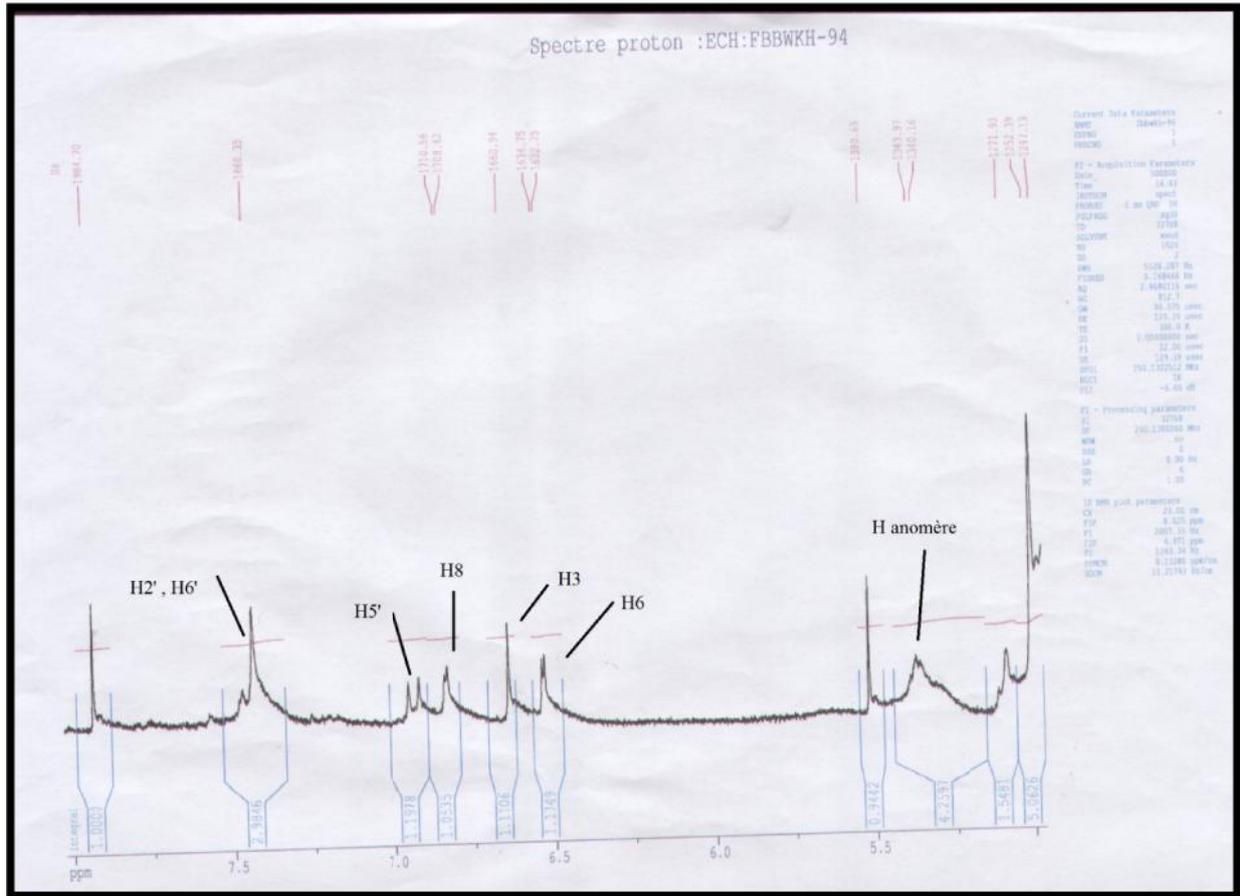


Fig.29 : Spectre RMNH¹ (MeOH-d₄ ; 250 MHz) étalé (5-8ppm).

La combinaison de ces données nous mène à proposer la structure suivante (fig.30) :

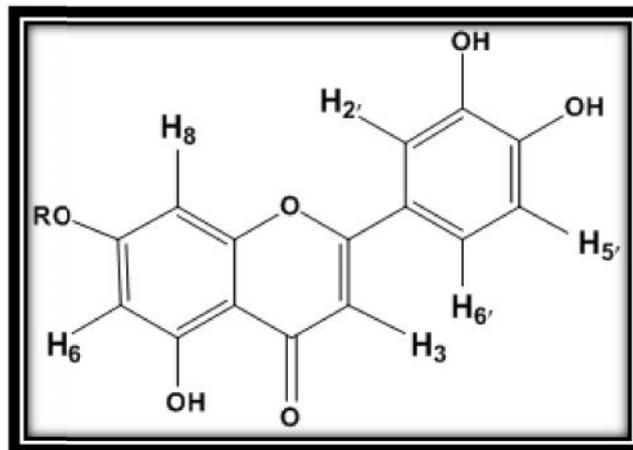


Fig. 30 : structure partielle du composé F9-4

Une hydrolyse acide dont le mode opératoire est détaillé dans le chapitre III est effectuée sur ce composé afin de déterminer la nature du sucre. Après concentration des phases organiques et aqueuses, nous avons procédé à une Co-chromatographie sur plaque analytique recouverte de terre siliceuse F_{254} et éluée par le système Acétone-eau (9-1) de la phase aqueuse en présence d'échantillons authentiques des sucres, il est apparu que le sucre en question est le glucose comme montre la figure 31 :

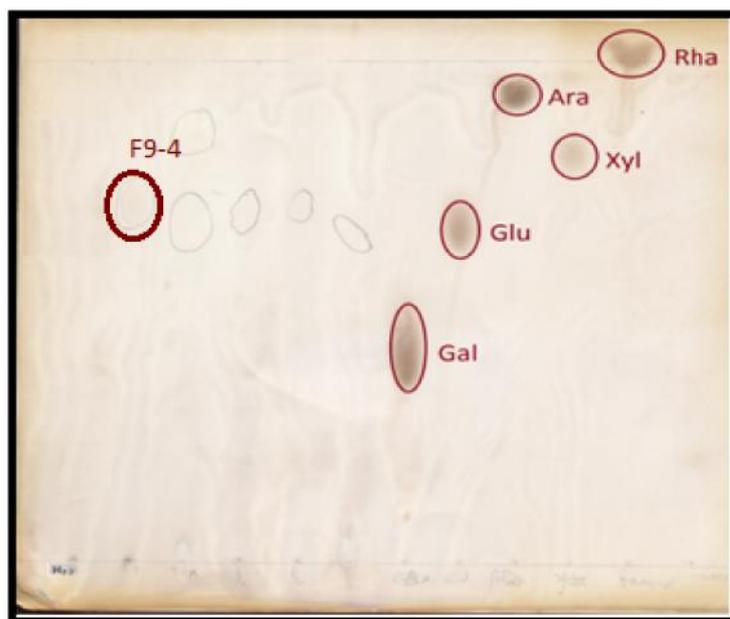


Fig.31 : Plaque d'hydrolyse

Le fait que le sucre se soit détaché de l'aglycone confirme bien la présence du pont oxygène entre les deux entités d'où la structure finale du composé F9-4

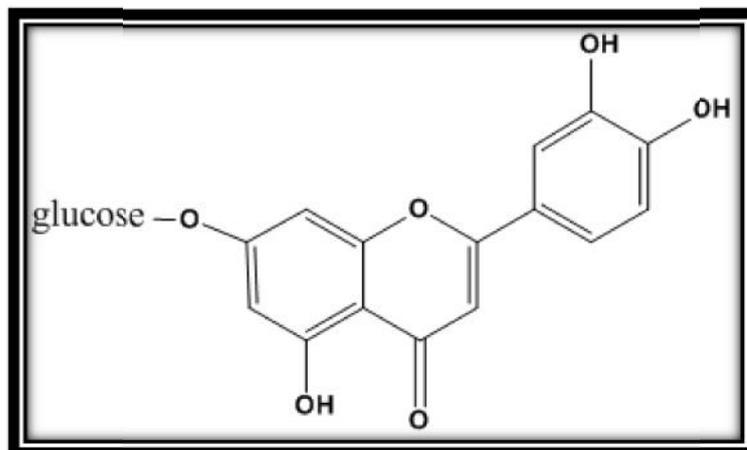


Fig.32 : Lutéoline 7-O- glucoside

Remarque :

La lutéoline 7-O- glucoside était isolée de *Verbascum scardicolum*^[1] et *Verbascum salviifolium*^[2]

V-2- 2- Identification du SF10- 8-2-1

Le composé SF10- 8-2-1 est de fluorescence noire violette sous lumière de Wood, il réagit avec les vapeurs du réactif NH_3 en donnant une coloration jaune, laissant envisager une structure de type flavonoïde (flavone ou flavonol substitué en 3). Les données de la série spectrale UV sont présentées dans le tableau 18 :

Tableau N°18 : résultat de la série spectrale UV visible pour SF10- 8-2-1

Réactif	Bande I (nm)	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (I)	Bande II (nm)	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (II)
MeOH	333		248	
NaOH	380	+47	248	
NaOH+5mn	380	+47	297	
AlCl ₃	356	+23	298	
AlCl ₃ + HCl	333	/MeOH : 0 / AlCl ₃ : -23	292	
NaOAc	372		252	+4
NaOAc +H ₃ BO ₃	372	+39	252	

Le spectre d'absorption ultraviolet (figure 33) enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 336 nm, oriente vers la structure d'une flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I (+ 47 nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en position 4'.

L'absence d'une nouvelle bande après addition de NaOH est révélatrice de l'absence d'un OH libre en position 7.

Il n'y a pas de déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl₃ + HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ce qui laisse penser à l'absence d'un OH libre en position 5.

Le déplacement bathochrome de la bande I (+ 36 nm) en comparant le spectre enregistré dans NaOAc + H₃BO₃ avec celui enregistré dans le méthanol laisse prévoir la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

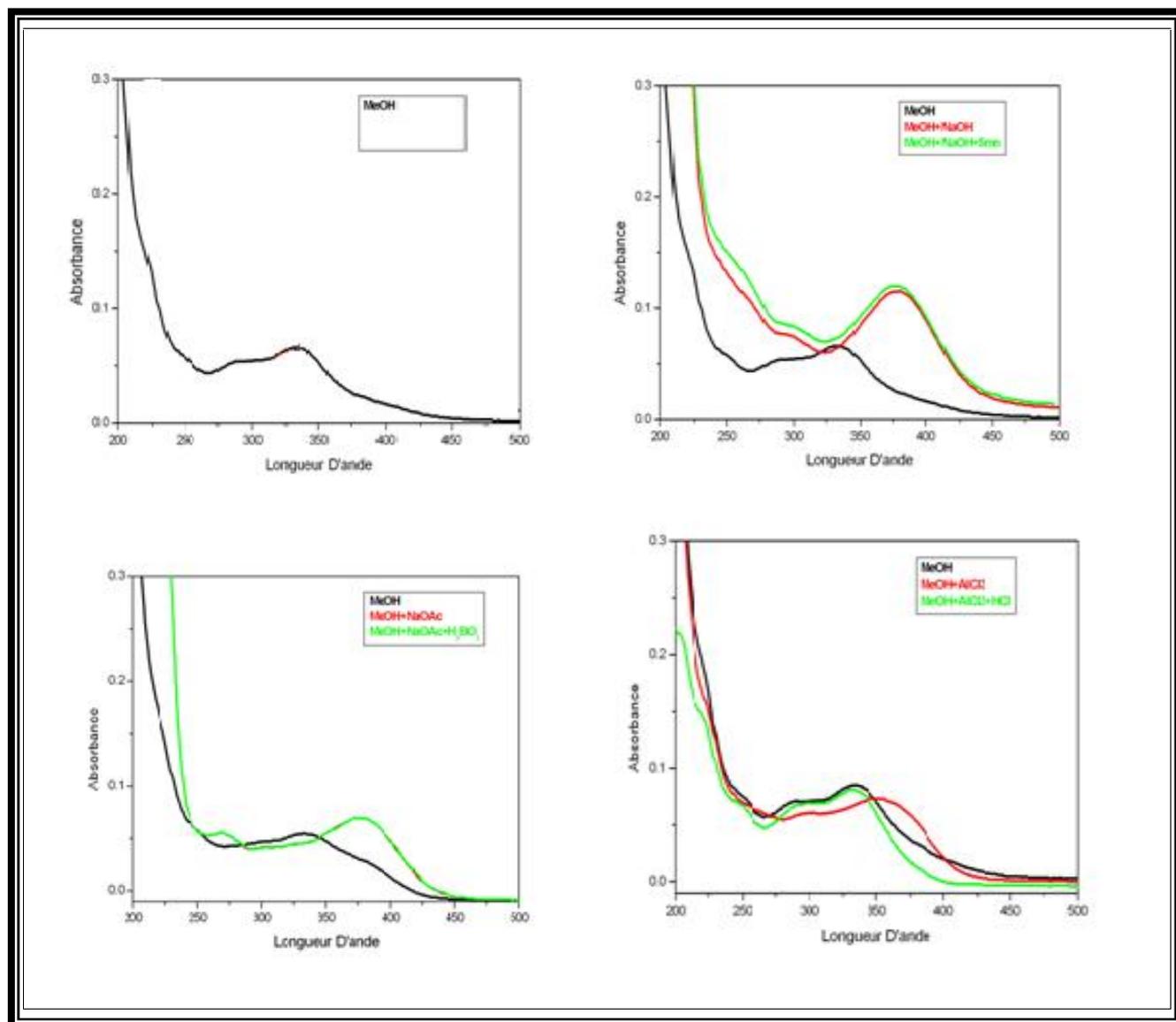


Fig.33 : La série des courbes spectrales d'UV visible de SF10-8-2-1.

L'examen du spectre RMN¹H (figure 34) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde entre 6,4 et 7,8ppm.

- Un signal à $\delta=4,8$ ppm partiellement recouvert pouvant caractériser un proton anomérique du sucre ainsi que d'autres signaux correspondant à ce sucre entre $\delta=3,8-3,0$ ppm.
- Un singulet à $\delta=3,6$ ppm peut être attribué au groupement méthoxyle.

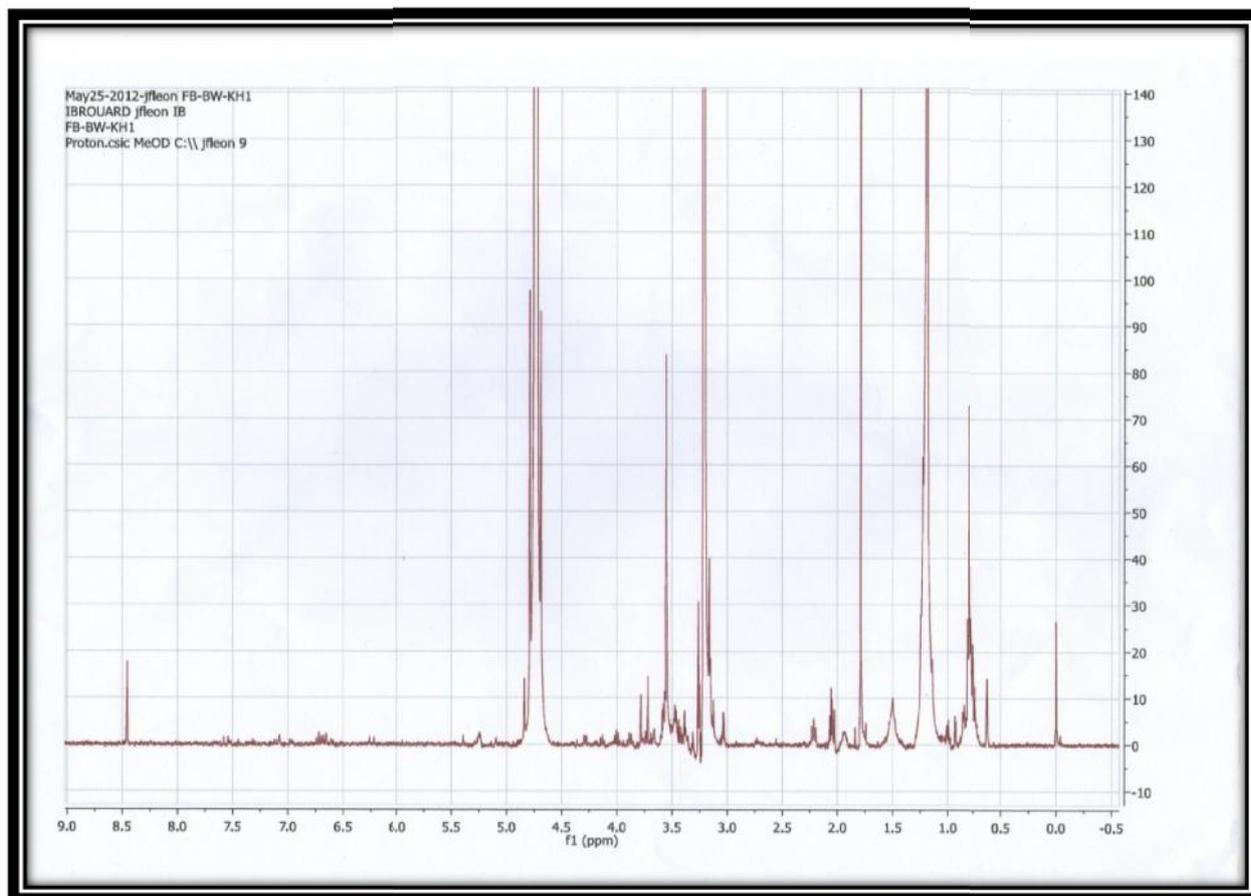


Fig.34 : Spectre RMN¹H (MeOH-d₄; 400 MHz) de SF10-2-1

Selon les résultats de la série spectrale UV, et le spectre RMN ^1H la structure partielle proposée pour le composé est la suivante (figure 35) :

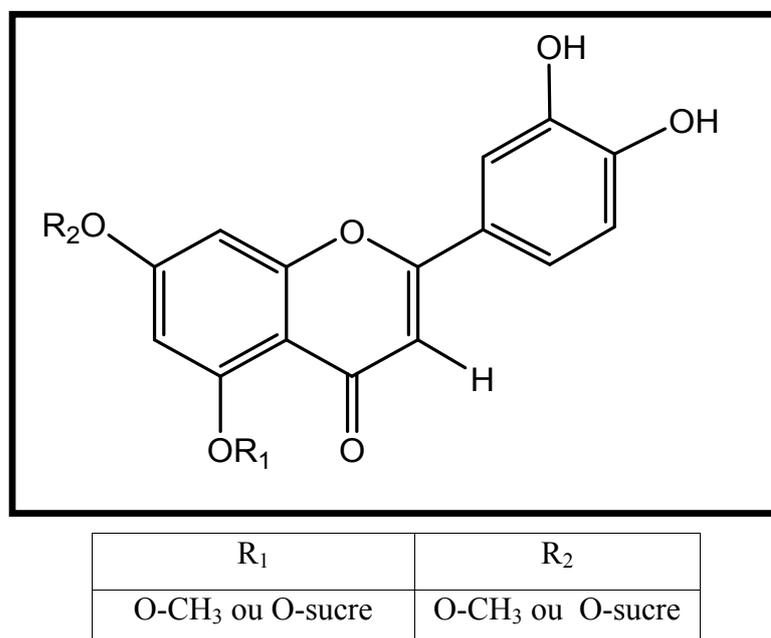


Fig. 35 : structure partielle du composé SF10-8-2-1

Pour déterminer la nature du sucre, on applique l'hydrolyse acide. Pour cela on prend une quantité de produit diluée dans le minimum de méthanol, on y ajoute 2ml d'HCl (2N), on met la solution dans un bain marie bouillant (100°C) pendant 120 à 160 minutes. La récupération des composés flavoniques se fait par extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse résiduelle de l'hydrolyse est évaporée à sec sous pression réduite, reprise par de l'eau et évaporée à nouveau. On répète plusieurs fois cette opération jusqu'à disparition totale de la réaction acide. Le résidu ainsi obtenu est lavé au méthanol avant d'être dissout dans l'eau pour analyse. On vaporise ensuite une plaque (trésiliceuse) avec une solution de NaH_2PO_4 (0,2M). On laisse sécher à l'air libre quelques minutes avant de l'activer à 100°C pendant 1 heure dans l'étuve. On fait deux éluions successives intercalées de séchage à l'air pendant 1 heure, le système d'éluion utilisé est Acétone / Eau : (9/1). La révélation se fait par pulvérisation de la plaque avec le malonate d'aniline, ensuite on la laisse séchée 5 min à 100°C. Les taches apparaissent bruns à l'œil nu et jaune sous la lampe UV ($\lambda = 365\text{nm}$). La figure 36 représente le résultat de cette étape. Il est apparu que le sucre en question est le glucose.

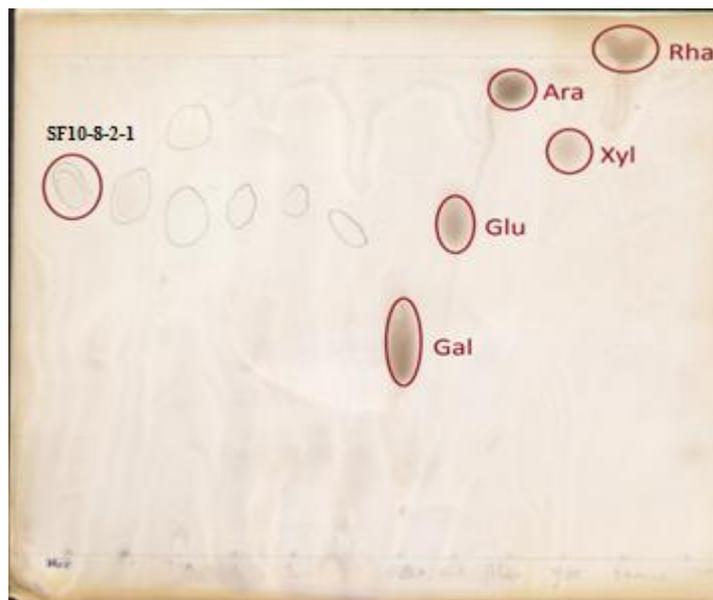


Fig.36 : Co-chromatographie avec des échantillons authentiques de sucres, de la phase aqueuse après hydrolyse acide du composé SF10-8-2-1.

- Le fait que le sucre soit détaché de l'aglycone confirme bien la présence du pont oxygène entre les deux entités.
- D'autre part on examine la phase organique du composé SF10-8-2-1 en enregistrant le spectre UV en présence de NaOH (base forte) et NaOAc (base faible), (tableau18). pour déterminer la position du groupe O-glucose.
- L'ajout de la base faible (NaOAc) ne provoque pas de déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = 0$) pas de OH en position 7.

Cette constatation permet de positionner le glucose en C-5.

Les résultats d'UV sont présentés dans le tableau 19 et la figure 37.

Tableau N°19 : Résultats de la série spectrale U-V de la genine

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	310	229
NaOH	310	229
AlCl₃	312	212
AlCl₃+ HCl	311	211
NaOAc	308	229
NaOAc +H₃BO₃	308	229

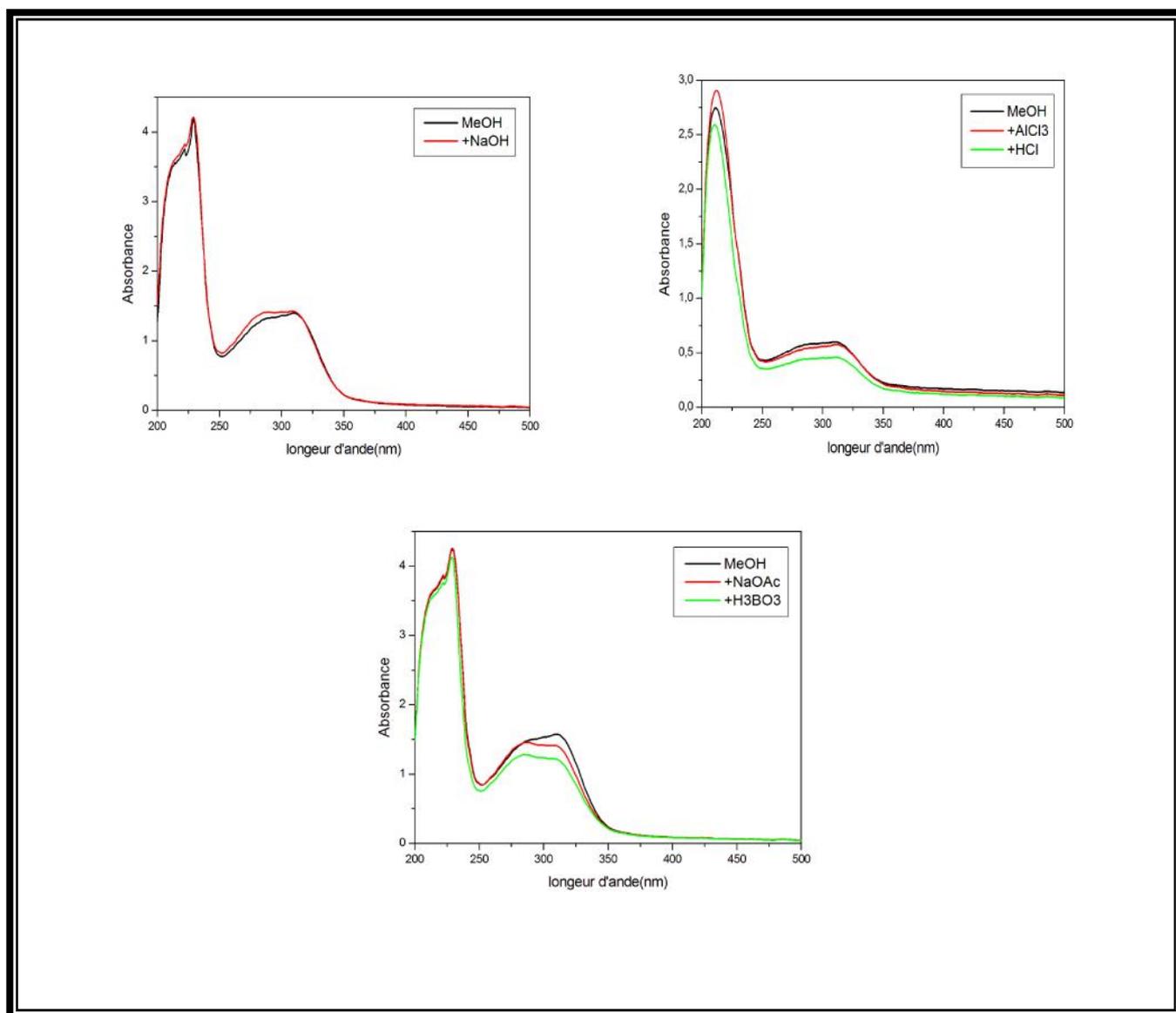


Fig.37 : La série des courbes spectrales d'UV visible de la partie génine de SF10-8-2-1.

Les résultats des données de la série spectrale UV combinées à celle de la RMN¹H, et l'hydrolyse acide du composé me permettent de proposer la structure suivante :

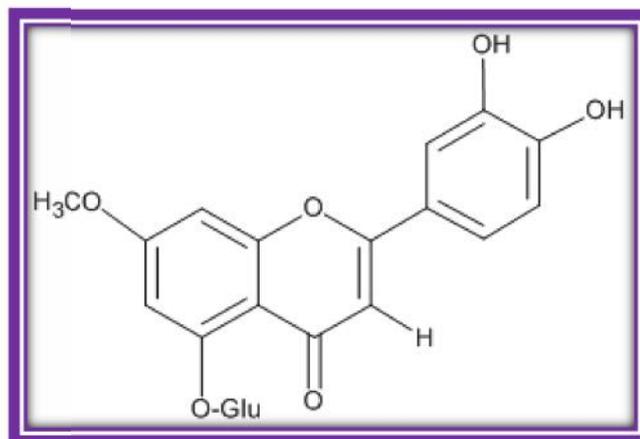


Fig.38 : 3',4'- dihydroxy 7- méthoxyflavone 5 – O- glycosyl

Remarque :

D'après l'étude bibliographique, ce composé n'a jamais été isolé du genre *Verbascum*

V-2- 3-Identification du SF10- 20-1

La couleur noir-violette sous la lumière de Wood et la valeur de la longueur d'onde de la bande I (350nm) de ce composés laissent envisager une structure de type flavone ou flavonol (3OR).

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +52$ nm), oriente vers la présence d'un OH en position 4'.

L'absence d'une nouvelle bande après l'addition de NaOH est révélatrice de l'absence d'un hydroxyle en position 7 ce qui est confirmé par le déplacement très faible ($\Delta\lambda = +1$ nm) de la bande II en présence NaOAc. Le spectre enregistré en présence de HCl+ AlCl₃ par rapport au spectre dans le MeOH, montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +33$ nm), indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 5. Un effet bathochrome de la bande I observé après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre dans le Méthanol, ($\Delta\lambda = +36$ nm) indique la présence d'un Ortho di OH sur le noyau B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 20 :

Tableau N° 20 : résultat de la série spectrale UV visible pour SF10- 20-1

Réactif	Bande I (nm)	$\Delta\lambda_{\max}$ (I)	Bande II (nm)	$\Delta\lambda_{\max}$ (II)
MeOH	350		264	
NaOH	402	+52	264	
NaOH+5mn	402	+52	264	
AlCl ₃	426	+76	273-296	
AlCl ₃ + HCl	356-383	/MeOH : + 33 / AlCl ₃ : -43	264-295	
NaOAc	409		265	+1
NaOAc +H ₃ BO ₃	386	+36	265	

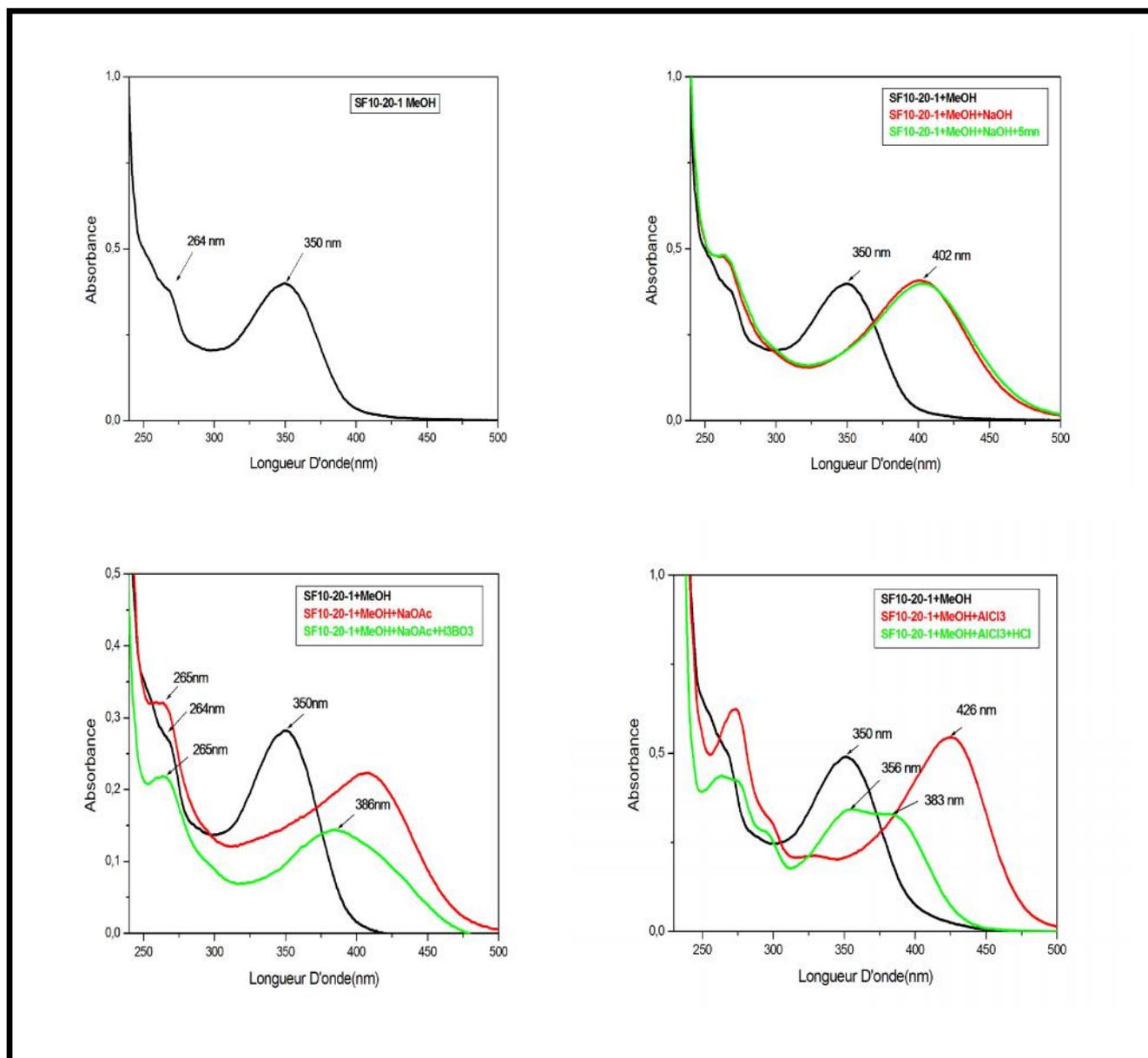


Fig.39 : La série des courbes spectrales d'UV visible de SF10-20-1.

L'étude des spectres RMNH¹ de ce composés (figures 40 et 41) montre la présence la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone reconnaissable par :

- Un singulet à $\delta = 6,77$ ppm attribuable à H-3.
- Deux double, le premier à $\delta = 6,46$ ppm, le second à $\delta = 6,80$ ppm avec une constante de couplage $J = 2,1$ Hz (couplage méta) attribuable à H-6 et H-8 respectivement, confirmant la substitution de la position 7.
- Un doublet ($J = 2$ Hz) à $\delta = 7,45$ ppm caractéristique de H-2'.
- Un doublet de doublet ($J = 8,2$ Hz et $J = 2$ Hz) à $\delta = 7,48$ ppm attribuable à H-6'.
- Un doublet à $\delta = 6,94$ ppm avec $J = 8,2$ Hz attribuable à H-5'.
- À $\delta = 3,3$ ppm, un singulet qui peut être attribué à un OCH₃.
- Un signal à $\delta = 5,1$ ppm attribué au H anomérique d'un sucre.
- Un ensemble de signaux dans la zone de 3 à 4 ppm qui peuvent être attribués aux autres protons du sucre.

L'ensemble des données relatives à la RMNH¹ de ce composé est reproduit dans le tableau 21 :

Tableau N°21: Les données spectrales de RMNH¹ du SF10- 20-1 :

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	J (Hz)	Attribu à
5,1	1H	d	7,2	H anomérique
6,46	1H	d	2,1	H ₆
6,77	1H	s	/	H ₃
6,80	1H	d	2,1	H ₈
6,94	1H	d	8,2	H _{5'}
7,45	1H	d	2	H _{2'}
7,48	1H	dd	8,2-2	H _{6'}
3,3	3H	s	/	

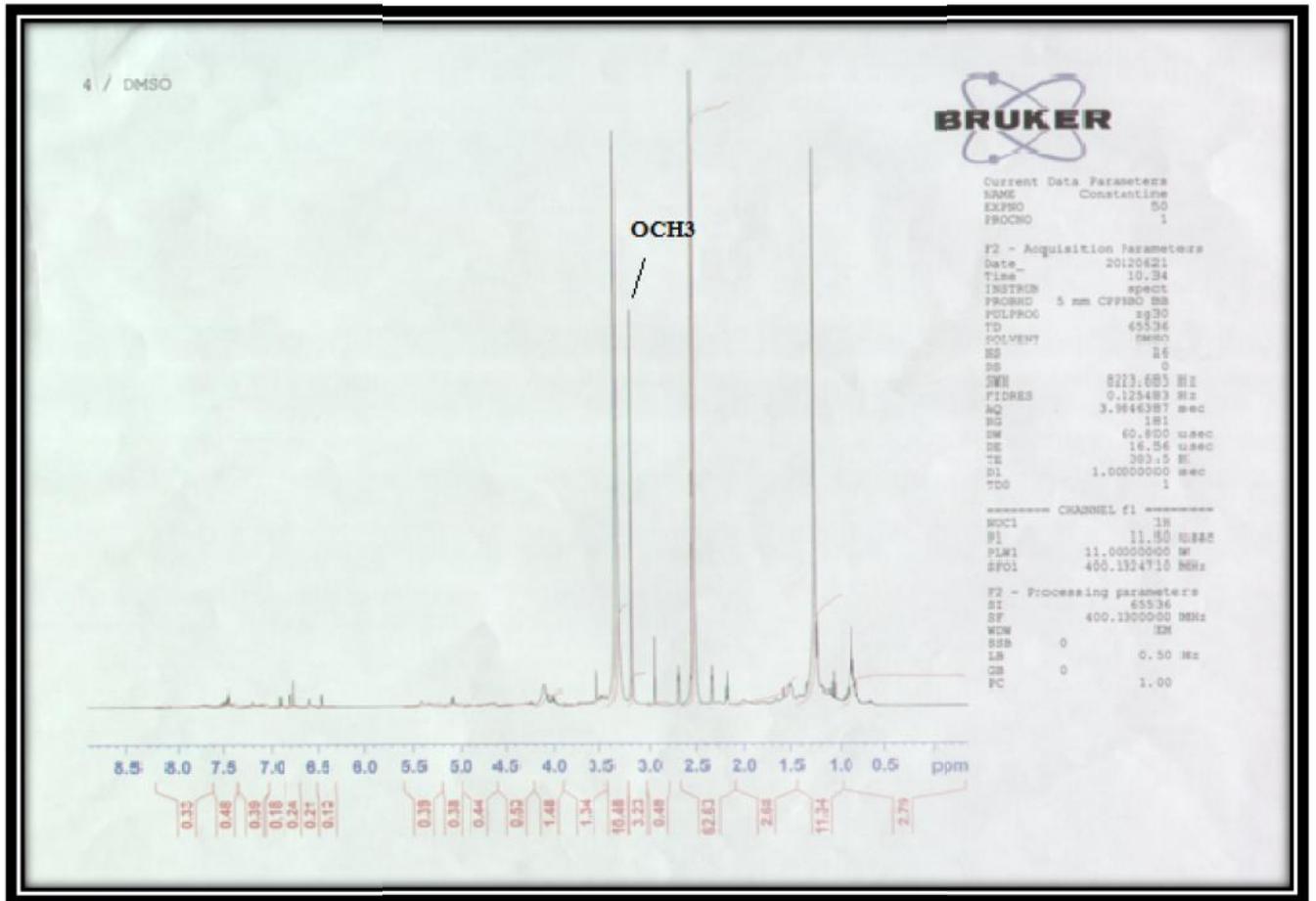


Fig.40 : Spectre RMNH¹ (DMSO-d₆ ; 400MHz) de SF10-20 -1

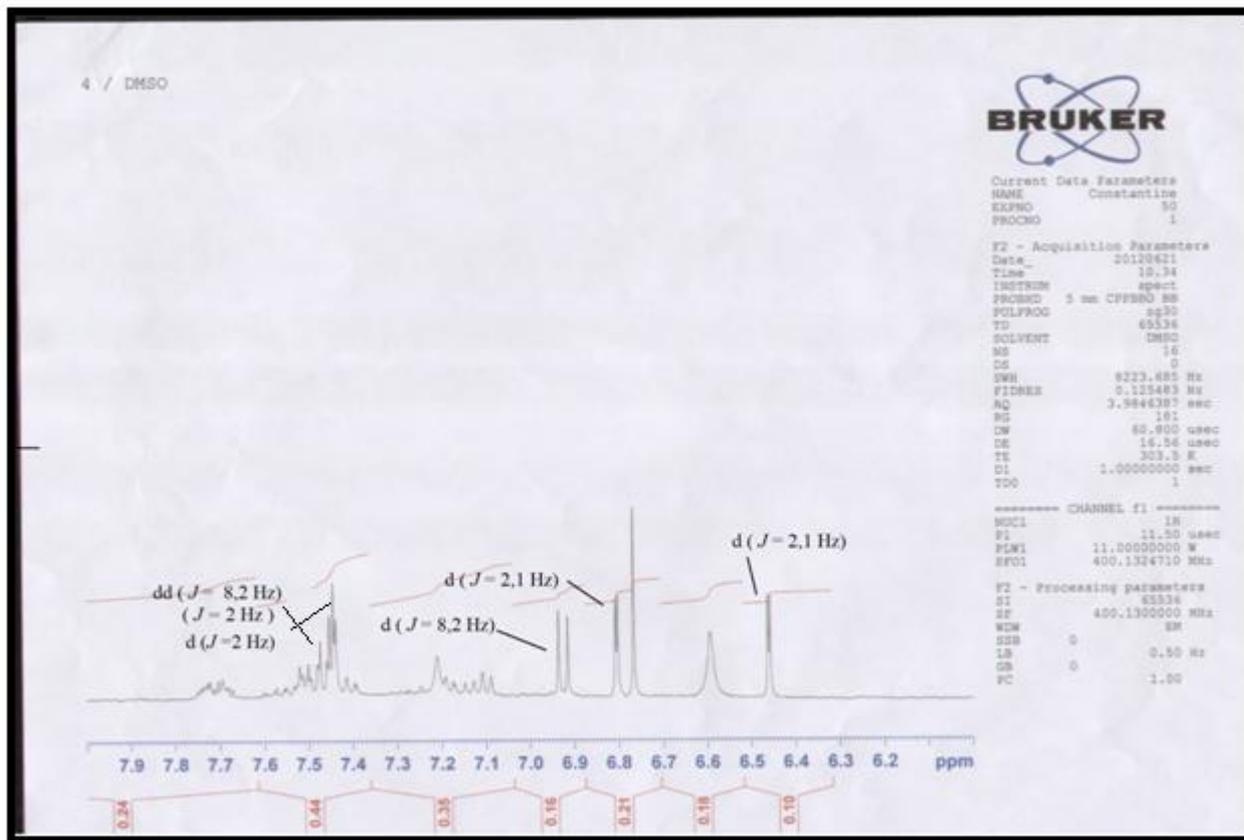


Fig.41 : Spectre RMNH¹ (DMSO-d₆ ; 400MHz) de SF10-20 -1

Les données de la RMNH¹ combinées à ceux de l'UV-visible nous amènent à la structure suivante :

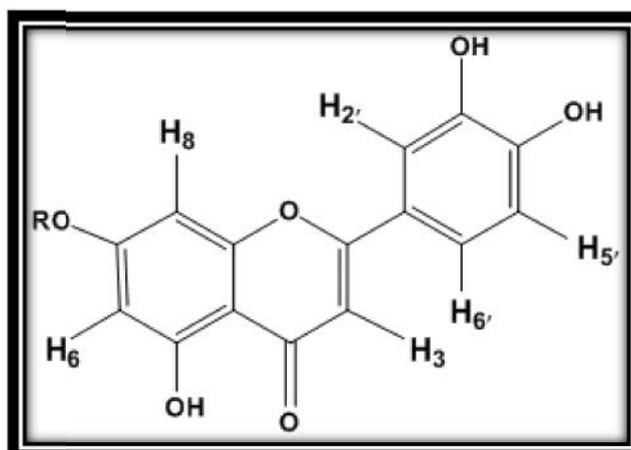


Fig. 42 : structure partielle du composé SF10-20-1

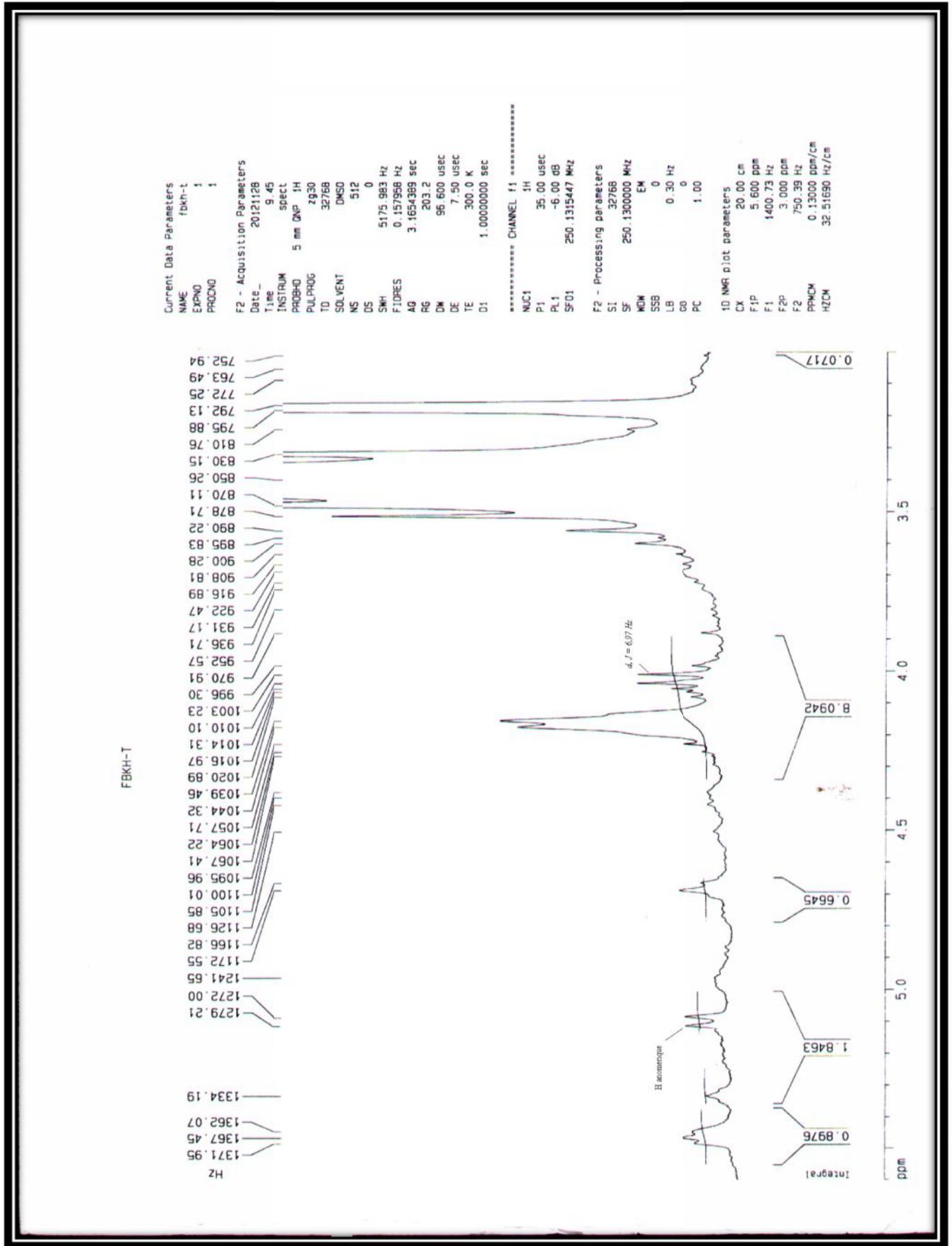


Fig.43 : Spectre RMNH¹ (DMSO-d₆ ; 250MHz) de SF10-20-1

Pour déterminer la nature du sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide de ce composé dont le mode opératoire est décrit précédemment.

On constate que la Co-chromatographie de la phase aqueuse après hydrolyse acide de notre produit ne correspond à aucune tache des échantillons authentiques du sucre soit : le glucose, rhamnose, galactose, xylose, arabinose, fructose. Ce que nous laisse penser au méthyl glucuronide ou au méthyl galacturonide ceci est confirmé par la présence du méthoxyle dans le spectre RMN¹ (figure 40) ainsi que le signal sous forme de doublet ($J = 6,97$ Hz) à $\delta = 4$ ppm correspondant au proton 5'' du sucre (figure 43), qui confirme bien la structure du galactose d'après la constante de couplage. Donc la structure probable de ce composé est représentée dans la figure 44 :

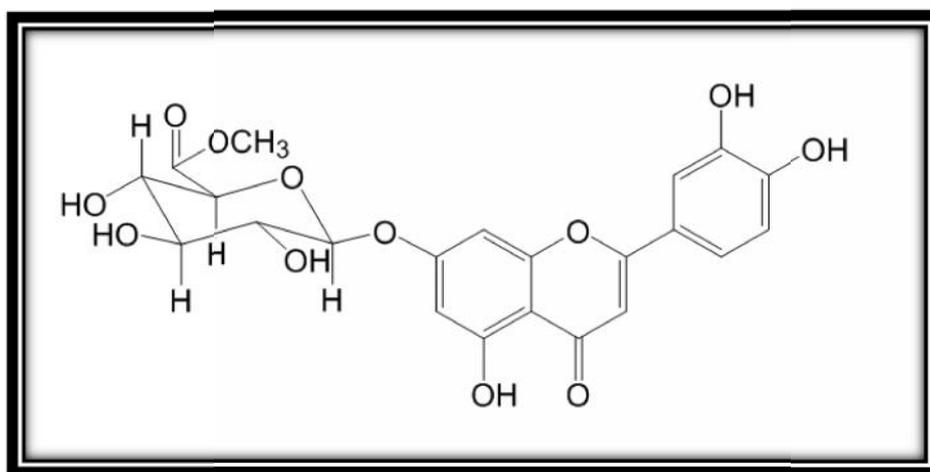


Fig.44 : Lutéoline 7-O- β - méthyl glucuronide.

Remarque :

Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Verbascum*.

Conclusion :

Les autres produits isolés et purifiés des fractions étudiées de la phase *n*-butanol sont en cours d'étude afin d'élucider leurs structure final.

Références bibliographiques :

- [1] P. Naumov et al, *flavonoïds of Verbascum scardicum and Melampyrum scardicum*, Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, **1998**, V17, N°1, pp.141–441.
- [2] M. López-Lázaro, *distribution and biological activities of the flavonoid luteolin*, department of pharmacology, Spain, mini reviews in medicinal chemistry, **2009**, V9, pp.31-59.

Chapitre VI

Résultats et discussion de l'étude biologique

VI- L'activité anti-oxydante *in vitro* de l'extrait n-butanol de *Verbascum atlanticum* batt.

Introduction :

Plusieurs travaux sont portés ces dernières années sur les effets bénéfiques de composés phénoliques considérés comme des antioxydants naturels et des neutralisants des radicaux libres qui sont la première cause de plusieurs maladies cardiovasculaires et cancéreuse ^[1].

L'activité anti-oxydante *in vitro* de l'extrait *n*-butanol de *Verbascum atlanticum* batt. est investiguée par l'évaluation du potentiel antioxydant en utilisant la méthode d'inhibition de radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

VI -1- Mode opératoire:

VI -1-1-La méthode de DPPH :

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur la capacité des atomes d'hydrogène dans l'extrait à décolorer la couleur de la solution méthanol de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) utilisé comme réactif (fig.39).

Plusieurs concentrations de l'échantillon dans le méthanol sont ajoutées au 3ml de solution de DPPH (0,004% de méthanol).Après une période de 30mn d'incubation dans la température de la chambre.

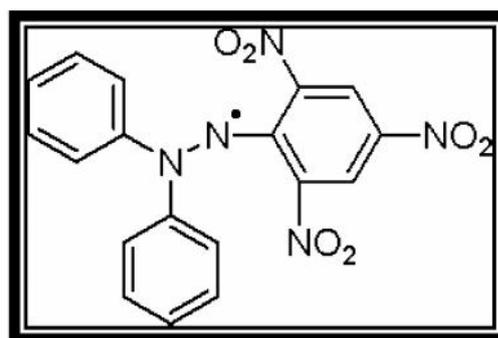


Fig.45 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 Diphényle-1-PicrylHydrazyle)

VI -2- Méthode de calcul :

- **Calcul des pourcentages d'inhibitions**

Le calcul des pourcentages d'inhibition est par la formule suivante :

$$I \% = ((A_c - A_t) / A_c) \times 100$$

A_c : absorbance du contrôle.

A_t : absorbance du test effectué.

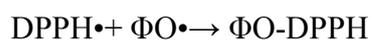
- **Calcul des IC₅₀**

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ : Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH•.

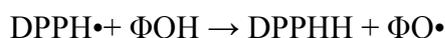
Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés de pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées^[2].

VI -3-Résultat et discussion

La méthode de DPPH est une méthode largement utilisée pour évaluer l'activité des antioxydants à piéger les radicaux libres. Dans le test DPPH, les antioxydants sont capables de réduire le radical DPPH (violet) à la forme non radicale DPPH-H (jaune). Cette activité est due à leurs capacités de donner d'hydrogène^[3]. Le radical DPPH accepte un électron ou un radical d'hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable avec une autre couleur selon la réaction suivante :



Ainsi, le degré de décoloration du pourpre au jaune est attribué à la capacité donneuse d'hydrogène du composé ajouté, ce qui est révélateur de son potentiel de piégeage des radicaux^[4].



Dans la présente étude, la capacité de piégeage des radicaux libres du DPPH du l'extrait n-butanol de *Verbascum atlanticum* batt. a été calculé de manière dépendante de différents doses.

L'extrait n-butanol de *Verbascum atlanticum* batt. est avéré être un piège efficace de radicaux du DPPH **IC₅₀ = 29,43** par rapport à la vitamine C **IC₅₀ = 5,183**.

Les figures 35 et 36 représentent les résultats de l'activité anti radicalaire de l'extrait n-butanol (échantillon testé) de la plante et de l'acide ascorbique (contrôle positif).

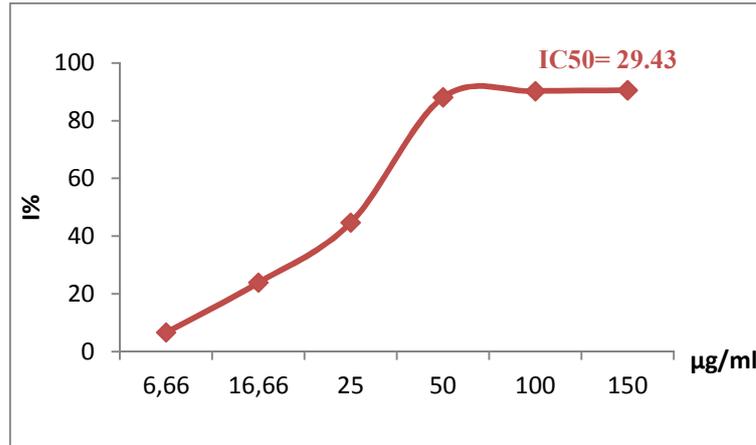


Fig.46 : Effet de piégeage du DPPH% des échantillons testés

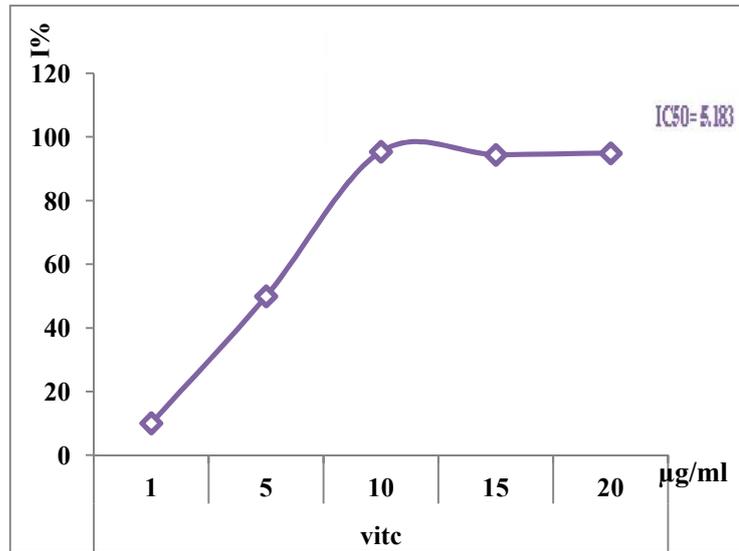


Fig.47 : Effet de piégeage du DPPH% de la vitamine C.

Conclusion

On constate que l'activité de piéger les radicaux libres par l'extrait polaire *n*-butanol nous oriente vers la présence des molécules de type flavonoïdes ce qui renforce nos données bibliographique.

Référence bibliographiques

- [1] J.Li et al., *The in vitro antioxidant activity of lotus germ oil from supercritical fluid carbon dioxide extraction*, Food Chemistry, **2009**, pp.939–944.
- [2] K.Kanoun, *Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de Myrtus communis L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine)*, université Aboubakr Belkaid Tlemcen, **2010**, p.27.
- [3] J. Liua et al., *In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3*, Carbohydrate Polymers, **2010**, V82, pp. 1278–1283.
- [4] Hung-Chih Ting et al, *The in vitro and in vivo antioxidant properties of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil*, Food Chemistry, **2011**, V125, pp. 652–659.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail nous nous sommes intéressés à l'investigation phytochimique de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcolique de l'espèce *Verbascum atlanticum*. Le choix de cette plante est justifié par le fait qu'elle n'a jamais été étudiée auparavant.

Le screening chimique de l'espèce a révélé la présence des flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes, saponines, et des leucoanthocyanes dans ces parties aériennes.

Après extraction du matériel végétal suivi d'affrontements par des solvants de polarité croissante, la séparation de l'extrait *n*-butanol par les différentes méthodes chromatographique a permis l'isolement de sept produits à l'état pur et d'établir la structure de trois d'entre eux à l'heure actuelle :

- **Lutéoline 7-*O*- glucoside**
- **3',4'- dihydroxy 7- méthoxyflavone 5- *O*- glucosyl.**
- **Lutéoline 7-*O*- β - méthyl glucuronide.**

L'identification de ces composés est faite par les différentes méthodes spectroscopiques notamment ceux de la RMN monodimensionnelle et la spectroscopie UV -visible.

La mise en évidence de l'activité antioxydant de l'extrait *n*-butanol par le test au DPPH est avérée concluante.

Il est important de signaler que les résultats obtenu de cette étude sont originaux pour l'espèce étudiée.

ملخص

هدف الدراسة التي قمنا بها هو معرفة الأسرة Scrophulariaceae من خلال الجنس *Verbascum* المعروف أنواعه بالقدرة العلاجية ضد السل.

أدت الفحوص الكيميائية التي أجريت على النوع *Verbascum atlanticum* الى الكشف على وجود مجموعات كيميائية عديدة مثل مركبات الفلغونويدات و التربينات.

أما الدراسة الكروماتوغرافية لمستخلص البيتانول سمحت باستخراج وعزل سبع مركبات و قد تم تحديد بنية ثلاثة منهم في الوقت الحاضر وهي:

- **Lutéoline 7-O- β -glucoside**
- **3',4'- dihydroxy 7- méthoxyflavone 5 – O- glycosyl**
- **Lutéoline 7-O- β - méthylgalacturonide**

تحديد بنيات هذه المركبات قد تم بواسطة الرنين النووي المغناطيسي للبروتون¹ والتحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية. اختبار النشاط المضاد للأكسدة (اختبار الجذر DPPH) كشف أن مستخلص البيتانول نشط جدا.

كلمات البحث: *Verbascum atlanticum* batt، screenig، الفلافونويد، Scrophulariaceae

Abstract

The study that we have undertaken is a contribution to the knowledge of the family Scrophulariaceae through the genus *Verbascum* where their species are known by their therapeutic effects against tuberculosis.

The phytochemical screening performed on the specie *Verbascum atlanticum* showed that the presence of several chemical groups such as flavonoids and terpenoids.

The chromatographic study of n-butanol extract allowed the isolation of seven products and the identification of three of them:

- **Luteolin 7-*O*- β -glucoside**
- **3', 4'-dihydroxy 7 - methoxyflavone 5 – *O*- glycosyl.**
- **Luteolin 7-*O*- β -méthylgalacturonide.**

The structures were established by a combination of NMRH1 data and UV-Visible spectroscopy.

Test the antioxidant activity (DPPH test) revealed that the *n*-butanol extract is very active.

Keywords: flavonoids, screening, Scrophulariaceae, *Verbascum atlanticum*,

Résumé

Le but de l'étude que nous avons entreprise constitue une contribution à la connaissance de la famille des scrofulariacées à travers le genre *Verbascum* dont ses espèces sont reconnus par leurs effets thérapeutiques contre la tuberculose.

Le screening phytochimique effectué sur l'espèce *verbascum atlanticum* a permis la mise en évidence de plusieurs groupes chimiques notamment les flavonoïdes et les terpenoïdes.

L'étude chromatographique de l'extrait *n*-butanol a permis d'isoler sept produits et d'identification trois d'entre eux à l'heure actuelle il s'agit de :

- **Lutéoline 7-*O*- β-glucoside**

- **3',4'- dihydroxy 7- méthoxyflavone 5 - O glycosyl.**

- **Lutéoline 7-*O*-β- méthylgalacturonide.**

Les structures ont été établies par la combinaison des données de RMN¹H et de la spectroscopie UV-Visible.

Le test de l'activité antioxydante (test au DPPH) a révélé que l'extrait *n*-butanol est très actif.

Mots clés : *Verbascum atlanticum*, screening, flavonoïdes, scrofulariacées