

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° de série.....

N° d'ordre.....

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du grade de

Magister en sciences

Domaine : chimie organique

Option : Phytochimie

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE *Globularia*
*alypum L.***

Sous la direction du professeur :
M^r BENAYACHE SAMIR

présenté par :
M^r BOUTITI AMEUR

Devant le jury

M^{me} F. BENAYACHE
M^r S. BENAYACHE
M^r A. BELATAR
M^r A. TENIOU
M^{elle} R. MEKKIOU

Pr. Université Mentouri
Pr. Université Mentouri
Pr. Université Mentouri
Pr. Université Mentouri
M. C. Université Mentouri

présidente
rapporteur
examineur
examineur
examinatrice

Dédicaces

A ma chère mère

*A la mémoire de mon père
qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.*

*A mes chers frères et sœurs ainsi que leur petite famille pour
leur aide et leur soutien moral.*

*A tous ceux qui m'ont consacré temps, patience et conseils surtout
dans les moments difficiles.*

*A toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon
éducation.*

Je dédie ce modeste travail.

Remerciements

Je tiens à remercier :

Monsieur Samir BENAYACHE, Directeur de mémoire

*Professeur en chimie organique des Substances Naturelles à l'Université Mentouri
CONSTANTINE*

&

Madame Fadila BENAYACHE,

*Professeur en chimie organique des Substances Naturelles à l'Université Mentouri
CONSTANTINE*

qui, durant ces deux années, ont bien voulu diriger
mes travaux de mémoire, en me faisant bénéficier de
leurs expérience, leur compétence et encouragements

Monsieur Abdelhamid BELATAR

Professeur de l'Université Mentouri de Constantine

Monsieur Abderahmene TENIOU

Professeur de l'Université Mentouri de Constantine

M^{elle} Ratiba MEKKIOU

Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de siéger dans le jury de
mémoire.

En témoignage de ma reconnaissance et respectueuse gratitude.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et notamment à :

Monsieur Ali Dendougui maître de conférences pour son aide constante et ses précieux conseils pendant toute la durée de ce travail.

J'ai également beaucoup apprécié l'atmosphère très agréable que messieurs

Mohamed BOUHROUM; Youcef MACHEHOUD

Pour l'accueil chaleureux qui m'ont toujours réservé dans le Laboratoire. Qu'ils

Veillent trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à melle Ouahiba BENAÏSSA Pour son accueil dès notre arrivé au Laboratoire, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie également monsieur KOLLI Elhadj Pour sa simplicité et sa disponibilité.

Mes Sincères remerciements vont également à melle BICHA Sabrina et ZAATER hanene pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Je ne saurai oublier tous mes collègues du laboratoire de valorisation des ressources naturelles et du laboratoire de phytochimie et analyses physico-chimiques et biologiques, ainsi que mes amis, Adlen, Chaouki, Rachid, Chouaib, Zahia, Kaoutar, Manel, Tiba, Hanene, Souada, Souad et Amel, Skander, Halima, Raouf, Zohra, Souhaila, Ouassima avec qui j'ai toujours su entretenir une ambiance chaleureuse et amicale.

Enfin, mes remerciements à mes proches, sans qui je ne serai peut être pas resté, pour m'avoir supporté lors des passages difficiles et tous ceux qui liront ce mémoire et le feront vivre.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Références bibliographiques.....	3

PARTIE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : les composés phénoliques

I-1-Introduction.....	4
I-2- Les composés phénoliques	6
I-2-1- Les composés phénoliques simples et les quinones, les acides phénoliques et les tannins	7
I-2-2- Les acides phénylpropanoïques (C ₆ C ₃), coumarines et lignines.....	10
I-2-3- Les flavonoïdes	11
I-2-3-1- L'intérêt thérapeutique des flavonoides	16
I-2-3-2- La biosynthèse des flavonoides.....	16
I-3-méthodes de séparation et de purification.....	17
I-3-1- Chromatographie sur colonne (C. C).....	18
I-3-2- La chromatographie sur papier (C.P).....	18
I-3-3- Chromatographie sur couches minces (C.C.M).....	19
I-4- Méthodes d'analyses structurales.....	19
I-4-1-Facteur de rétention (Rf).....	20
I-4-2- La spectrophotométrie UV-visible.....	21
I-4-2-1-Protocole.....	24
I-4-2-2-Lecture des spectres.....	24
I-4-2-3- Interprétation des spectres.....	25
I-4-2-4- La Spectrométrie de Masse (SM).....	25
I-4-2-5- La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	25
Références bibliographiques.....	26

Chapitre II : la famille Globulariacée

II-1- Description Botanique.....	30
II-1-1- Introduction.....	30
II-1-2- Taxonomie.....	30
II-1-3- Aspect botanique et répartition géographique.....	30
II-2- Usages traditionnels et activités biologiques.....	33
II-3- Études chimiques antérieures sur le genre.....	34
Références bibliographiques.....	46

Chapitre III : Étude phytochimique de l'espèce *Globularia alypum L.*

III-1- Introduction.....	50
III-2- Place dans la systématique	50
III-3- Description botanique et aire géographique.....	50
III-4- Etude chimique antérieure.....	52
III-5- Matériel végétal et extraction.....	53
III-6- Travaux extraction et de séparation chromatographique.....	53
III-7- Séparation sur couche mince	57
III-7-1- Purification du composé 25a à partir de la fraction 25.....	57
III-7-2- Fractionnement de 31.....	58
III-7-3- Purification de la sous fraction 26A.....	58
III-7-4- Purification de la sous fraction 36r.....	59
III-8- CONCLUSION.....	59
Références bibliographiques.....	60

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV-1- Détermination structurale des produits isolés de l'espèce.	62
IV-1-1- Le composé 26A	62

IV-1-2- Le composé 31C	70
IV-1-3- Le composé 25A	76
IV-1-4- Le composé 31D	79
Conclusion générale	82

Introduction :

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante les traditions thérapeutiques laissées par nos ancêtres.

La recherche de nouvelles substances d'origine végétale utiles à la médecine peut se faire selon plusieurs approches : l'une d'elles repose sur l'étude de l'utilisation traditionnelle des plantes par les peuples des différentes régions du globe en commençant tout particulièrement par celles qui sont les plus proches de nous à la fois sur le plan géographique et également sur le plan culturel. Ces informations sont suivies par l'identification du matériel végétal et de sa récolte. Dans une troisième étape, le matériel, bien déterminé, est soumis à une analyse chimique et biologique. Une autre approche consiste à recueillir les données phytochimiques propre à une espèce et essayer d'étendre les investigations à des espèces voisines ou des genres proches. A titre d'exemple, on sait d'après la littérature que les composées sont riches en dérivés de type sesquiterpène lactones et en flavonoides, on s'intéressera alors plus volontiers aux espèces faisant partie de cette famille. C'est ainsi que dans notre laboratoire tout un programme a été élaboré autour du genre *Centaurea* de la famille des composés ou autour d'autres genres de la même famille. [].

Sur la base de la première approche, ethnobotanique, cette étude s'est attelée à l'investigation phytochimique des globulariacées (*globularia alypum L.*), une plante présente en Algérie en plus du fait que l'espèce *G. alypum* n'a fait l'objet, à notre connaissance d'aucune recherche en Algérie. Ce travail avait également pour but une meilleure Connaissance chimiotaxonomique de ces espèces.

La présentation de nos travaux peut être répartie comme suit :

Le premier chapitre consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (les composés phénoliques, flavonoïdes), les différents squelettes flavoniques, leur biogenèse, leur diversité structurale et leur intérêt thérapeutique, reporte également toutes les démarches et les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de substances naturelles.

Le deuxième chapitre consacré à une présentation botanique de la famille Globulariacées et aux travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, reporte également les résultats relatifs aux activités biologiques et toxiques de ces plantes.

Le troisième chapitre traite la présentation des techniques d'isolement, et de purification des flavonoïdes et acides phénoliques de l'espèce étudiée.

Le quatrième chapitre renferme la discussion des résultats obtenus.
Enfin une conclusion générale.

I-1 Introduction

Les composés chimiques produits par les plantes de structures variés et ne participent pas au métabolisme de base commun à toutes les plantes, ces composés appartiennent au métabolisme dit secondaire.

Le tableau I-1 présente les principales classes de métabolites secondaires.

classe	Origine, biosynthèse	Nombre De structures	Distribution et activité
Alcanes, Aldéhydes, Cires	Acétate-malonate	nd	Feuille : cire cuticulaires
Lignines, Tannins	Acétate shikimique	nd	Paroi cellulaire précipitent les protéines
Terpenoïdes Monoterpenes	Acetate-mevalonate	1300	Huiles essentielles (conifères) forte odeur, repoussants
Sesquiterpènes		6500	Répandus, amers, toxiques
Diterpènes		2900	Latex et résine, parfois toxiques
Triterpènes		3600	Répandus, amers, toxiques, colorés
Stéroïdes Phytoecdysones	Acetate-mévalonate et autres	70	+ de 100 familles végétales antihormones
Polyphénols simples	Shikimate	1000	Universels (feuilles)
Coumarines	Shikimate-choismate	800	70 familles dicotylédones. Toxiques répandus
Flavonoïdes	Shikimate-malonate	4000	Universels, colorés, toxiques
Quinones	Shikimate- mévalonate	800	Répandus, colorés
Alcaloïdes	Hétérogène	10000	Angiospermes, toxiques, amers
Acides aminés non protéiques	Acides aminés	600	graines de légumineuse, répandus, toxiques.
Cyanogènes	Acides aminés	60	2500 espèces de 130 familles toxiques
Glucosinolates	Acides aminés	100	Crucifères, amers, acres
Amines		100	Angiospermes, repoussants, hallucinogènes

Tableau I-1 : Principales classes de métabolites secondaires. nd : non déterminé (Hartley, 2001 ; Panda and Khush , 1995)

Les principales voies de biosynthèse de ces composés, souvent complexes et peuvent être schématisées comme suit.

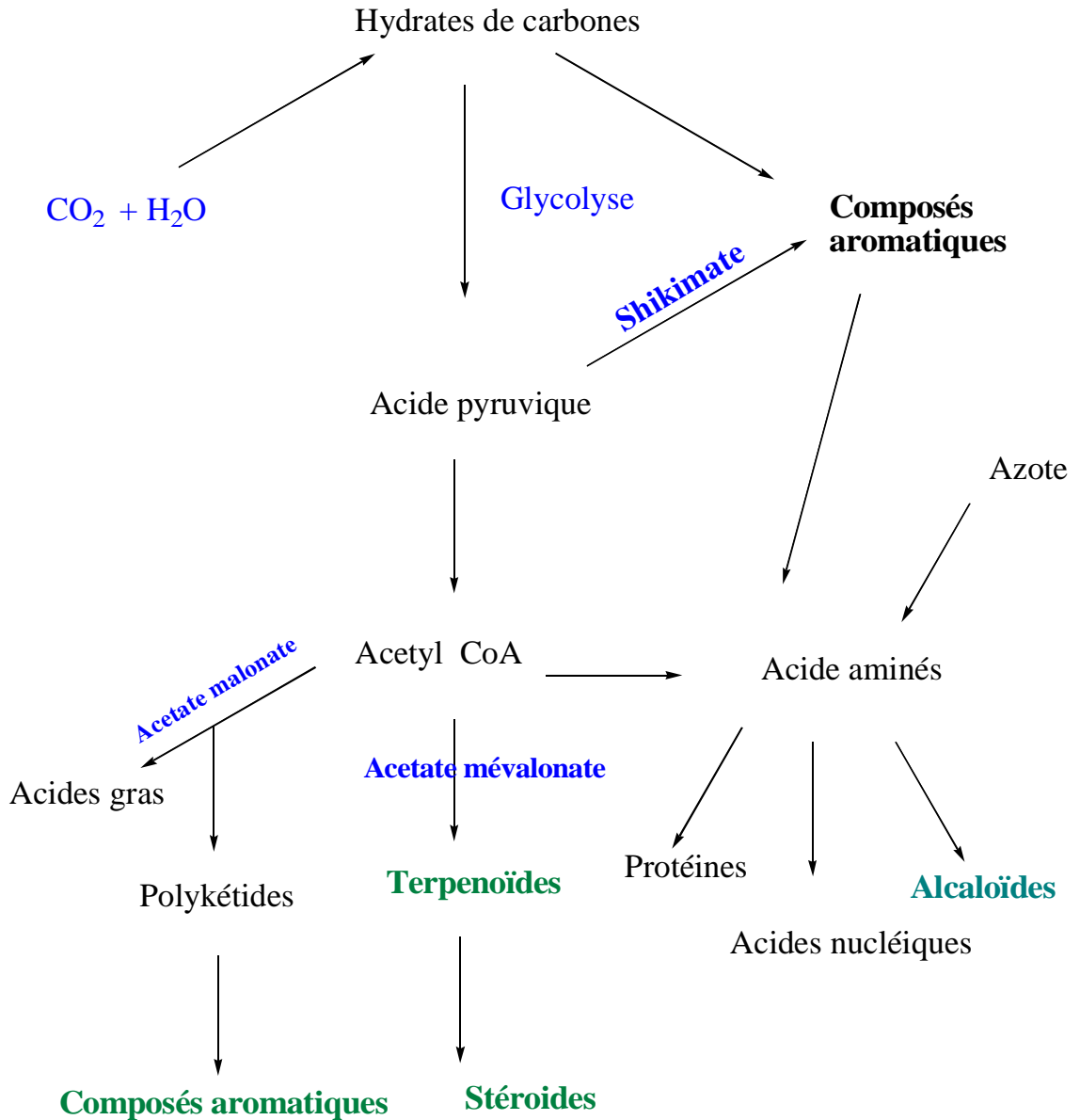


Figure I-1 : principales voies de biosynthèse impliquées dans la production des métabolites secondaires végétaux (Panda and Khush, 1995).

II- Les composés phénoliques.

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Parmi les milliers décrits, les plus nombreux sont les flavonoïdes. Leurs activités biologiques très diversifiées.

La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate (Figure I-2). La voie de biosynthèse de composés aromatiques à partir de cinnamate est spécifique des végétaux

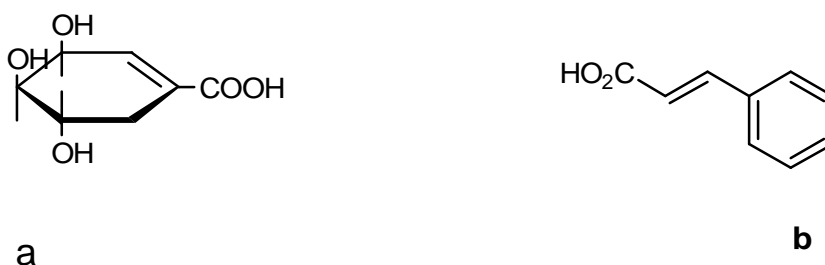


Figure I-2 : acide shikimique (a) et acide cinnamique (b).

Souvent acides, les polyphénols sont solubles dans une solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les o-dihydroxyphénols (catéchol). Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation. Un faible nombre de ces composés (cyanidine, quercétine, acide caféique) sont répandus mais la plupart n'ont qu'une faible occurrence. Leur rôle physiologique est encore incertain. Beaucoup de ces composés ont un effet sur la croissance lorsqu'ils sont appliqués sur des tissus à une concentration physiologique mais ils sont tellement variés structuralement qu'il paraît improbable qu'ils possèdent tous un rôle universel dans la régulation de la croissance et du développement. Toutefois, certains phénols peuvent avoir de telles propriétés, comme l'acide lunularique, un acide dihydro-stilbène-carboxylique qui aurait le rôle d'hormone de type dormine (=acide abscissique) chez l'hépatique *Lunularia cruciata* [1]. De plus l'équilibre entre l'acide p-coumarique et l'acide caféique pourrait réguler la synthèse d'éthylène. S'il est difficile d'attribuer un

rôle physiologique à la plupart des composés phénoliques, de très nombreuses données témoignent de leur rôle écologique. Les pigments flavonoïdes (en association avec les caroténoïdes) contribuent à l'attraction des insectes vis-à-vis des fruits et des fleurs colorés à disperser ou polliniser. De plus, ils sont parfois excrétés de la plante et peuvent affecter la croissance des autres plantes dans l'environnement immédiat (phénomène d'allélopathie) [2]. Certains flavonoïdes et surtout les tannins, astringents, sont des antiappétants protégeant les plantes de la prédation de nombreux animaux [3,4]. Ils peuvent également être toxiques pour les insectes : l'acide chlorogénique, très courant, en association avec la rutine des trichomes des feuilles de la tomate, est toxique pour *Heliothis zea* [5]. Enfin certaines classes de phénols agissent comme agent antimicrobien pour diverses bactéries, virus et champignons. Certaines phytoalexines phénoliques sont en effet synthétisées suite à une infection fongique chez au moins six familles végétales [6] et d'autres, en réaction à une exposition aux rayons ultraviolets (anthocyanes).

On peut distinguer différents types de composés phénoliques :

1- Les composés phénoliques simples et les quinones, les acides phénoliques et les tannins

Les composés simples comme le catéchol ou le phloroglucinol sont relativement peu communs contrairement aux acides phénoliques universellement répandue chez les végétaux. Ils se caractérisent par la perte au moins partielle des chaînes latérales caractéristiques (par rapport à l'acide cinnamique en C₆-C₃, Figure 2b). La vanilline, aldéhyde en C₆-C₁ est très répandus chez les angiospermes, gymnospermes et fougères. Il s'agit du principe odorant de *Vanilla planifolia*. L'hydroquinone (C₆) est la quinone simple la plus courante (surtout chez les Rosaceae et les Ericaceae), l'acide gallique (C₆C₁) est largement répandu surtout comme constituant des tanins (Figure I-3).

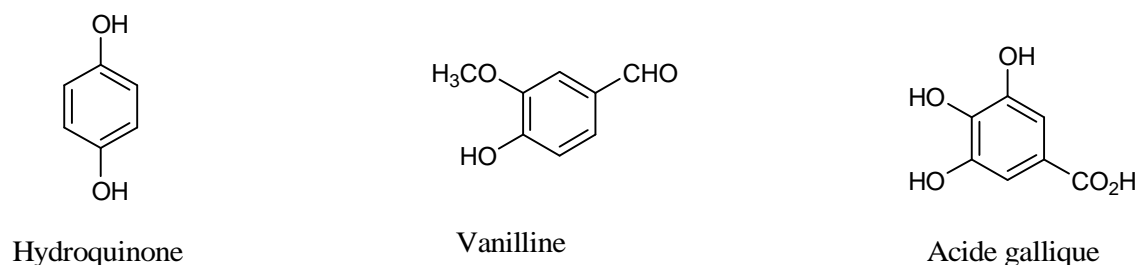


Figure I-3 : exemples des phénols simples.

Les tanins et les composés simples ont une action protectrice contre les attaques de microorganismes en se déposant dans les parois cellulaires. De plus les tanins ayant la propriété de précipiter les protéines réduiraient la valeur nutritionnelle de certains tissus végétaux. Ils affectent également la digestion des insectes en se liant aux mucoprotéines de leur cavité orale [7]. Ils sont classifiés en tanins hydrolysables (figure 4 b), les gallotanins (acide gallique et glucose) et ellagitanins (acide hexahydroxydiphénique) présents uniquement chez les dycotylédones et en tanins condensés (non-hydrolysables, figure I-4 a) plus répandus dans le règne végétal. Un troisième groupe de tanins les phlorotanins, a été caractérisé chez diverses algues brunes. Le rôle écologique des tanins condensés est bien illustré par les travaux de Colley [8] : les pousses de *Cecropia pelata* L. à fort taux de tanins ont un rendement de production de feuilles inférieur de 30% par rapport aux pousses à faible taux de tanins mais elles sont bien moins sensibles aux dommages d'herbivores. L'aire de feuille consommée par les larves généralistes de *Spodoptera latifascia*, est cinq fois plus grande sur les plantes à faible teneur en tanins que sur les plantes concentrées [7].

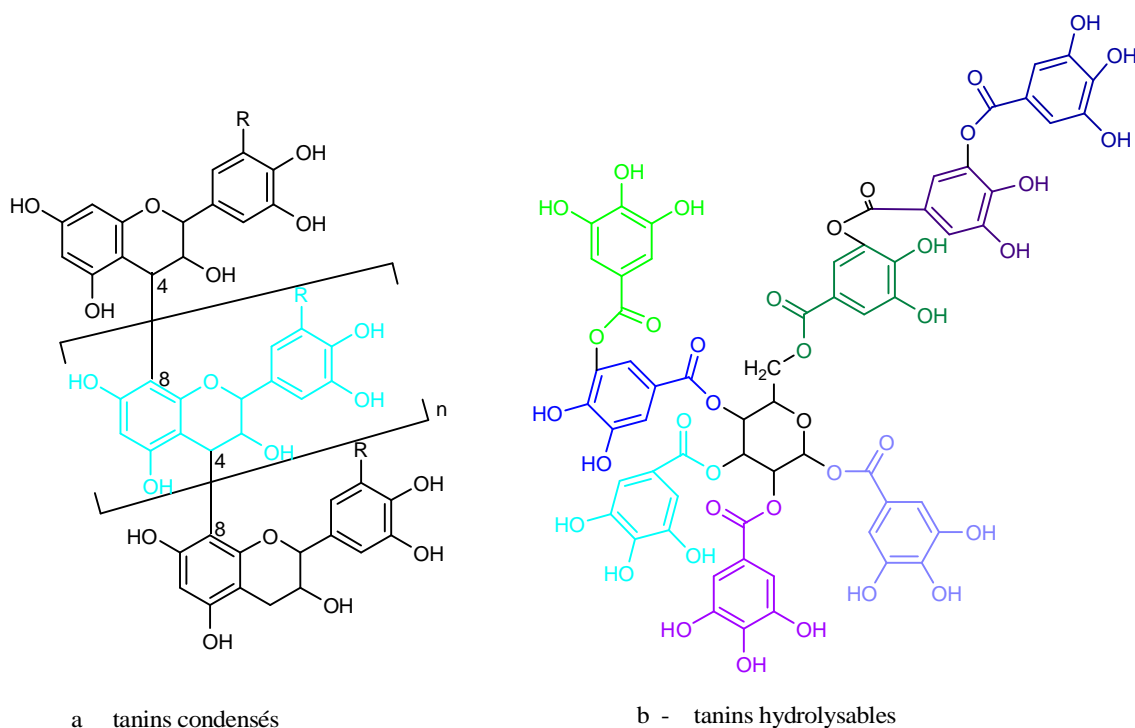


Figure I-4 : structures générales des deux types de tanins végétaux

Les quinones sont les plus souvent des hydroquinones. Elles peuvent être combinées à des sucres (anthroquinones). Largement mais inégalement réparties chez les végétaux supérieurs, elles proviennent de nombreux processus par différentes voies de biosynthèse. Le potentiel redox du couple quinone-hydroquinone est très important dans de nombreux systèmes biologiques. Les polyprénylquinones (quinones terpénoïdes) dérivent de l'acide 4-hydroxybenzoïque, leur noyau benzoquinone porte des chaînes polyisopréniques. Certains dérivés comme la plastoquinone et l'ubiquinone sont des transporteurs d'électrons. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou rendent inutilisables. Ceci explique la variété d'effets antimicrobiens potentiels des quinones. Nombre d'entre elles sont anti-appétantes et toxiques. La naphtoquinone juglone de l'écorce de *Carya ovata* inhibe la croissance de différents champignons et bactéries phytopathogènes et est répulsive pour *Scolytus multistriatus* [9].

2- Les acides phénylpropanoïques (C₆C₃), coumarines et lignines

Formés à partir de l'acide cinnamique ou p-coumarique, ils sont à l'origine des voies de synthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes, les stilbènes.

Les lignines des parois cellulaires secondaires leur confèrent une haute résistance à la traction et la pression grâce à leur élasticité. Il s'agit de mélange de polymères amorphes de 3 constituants fondamentaux, les alcools p-coumaryliques (qui dominant dans les lignines de Gramineae), coniféryliques (dominant dans le bois des conifères) et sinapyliques (bois des feuilles). Le rôle des lignines dans l'évolution des végétaux a été analysé par Raven (1977). Formant une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores. La lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure.

La coumarine (figure I-5) et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans 9 familles de monocotylédones de 70 familles de dicotylédones. Ils participent dans les racines des plantes symbiotiques hébergeant *Rhizobium*, à la formation des nodules. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de l'aspérule odorante et du mélilot desséchés. Elles possèdent un cycle lactone (cyclisation entre les groupes o-hydroxy et carboxyle). L'ombelliférone, l'aesculétine et la scopolétine sont les trois hydroxycoumarines les plus connues. Les furanocoumarines, de structure plus complexes sont beaucoup plus variées mais présentes dans un nombre limité de familles végétales. Elles dérivent principalement de l'ombelliférone par condensation avec un isoprénoïde en C₅, et sont souvent liposolubles [10]. Le cycle furane peut être fusionné au cycle benzénique dans deux positions : linéaire ou angulaire, cette dernière étant plus rare (Ombellifère et genre *Psoralea* des légumineuses). Elles présentent un intérêt physiologique, inhibant la croissance des graines en germination. Les coumarines en présence de radiation uv, se lient aux bases pyrimidiques

de l'ADN [11]. Elles sont donc phototoxiques pour un large panel d'organisme dont des bactéries, virus, champignons, invertébrés et vertébrés. La simple coumarine est ovicide pour les doryphores. La furocoumarine xanthotoxine incorporée à 0.1% dans l'aliment et irradiée d' UV entraîne 100% de mortalité chez *Prodenia eridania* [12].

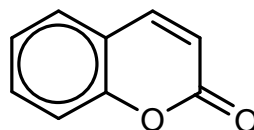


Figure I-5 : coumarine

3- Les flavonoïdes .

Ce groupe, le plus varié, contenant 4000 structures, comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs varient du blanc ivoire au jaune vif ou incolores [13]. Ils sont assez répandus dans le règne végétal [14]. Ils sont universels chez les angiospermes et les gymnospermes. Ils se trouvent dans les fruits, légumes, graines, tiges et fleurs [15], miel [16]. Ils ont tous en commun la structure de la flavane, 3 cycles dont un hétérocycle dont la configuration variée permet la classification en sous groupes (figure I-6) : flavones, flavanones, flavonols, flavanols, flavanediols, et chalcone dont l'hétérocycle n'est pas formé et qui est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des diverses flavonoïdes. Le noyau flavonoïde est souvent lié à un sucre pour former un glycoside hydrosoluble [17].

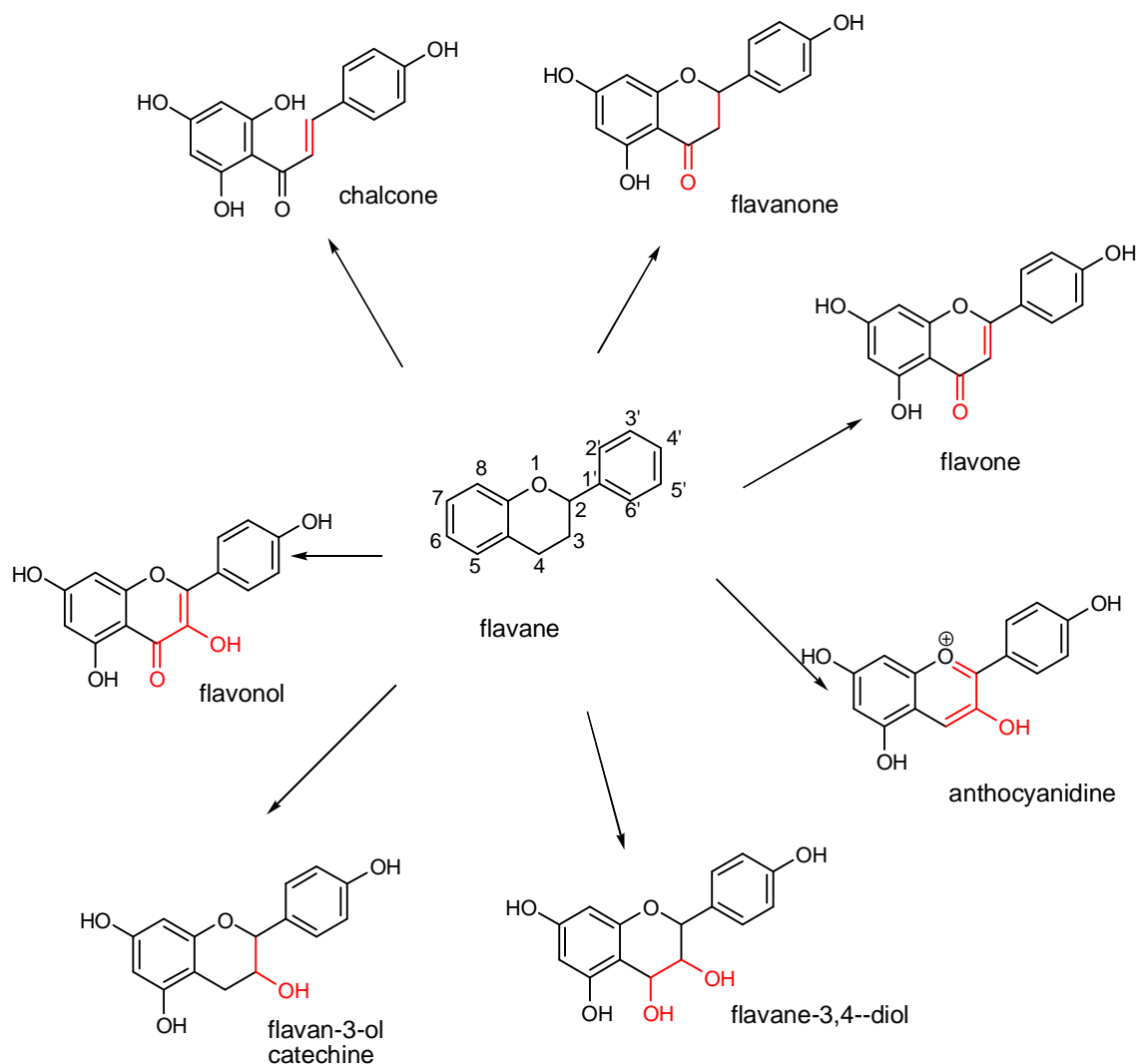
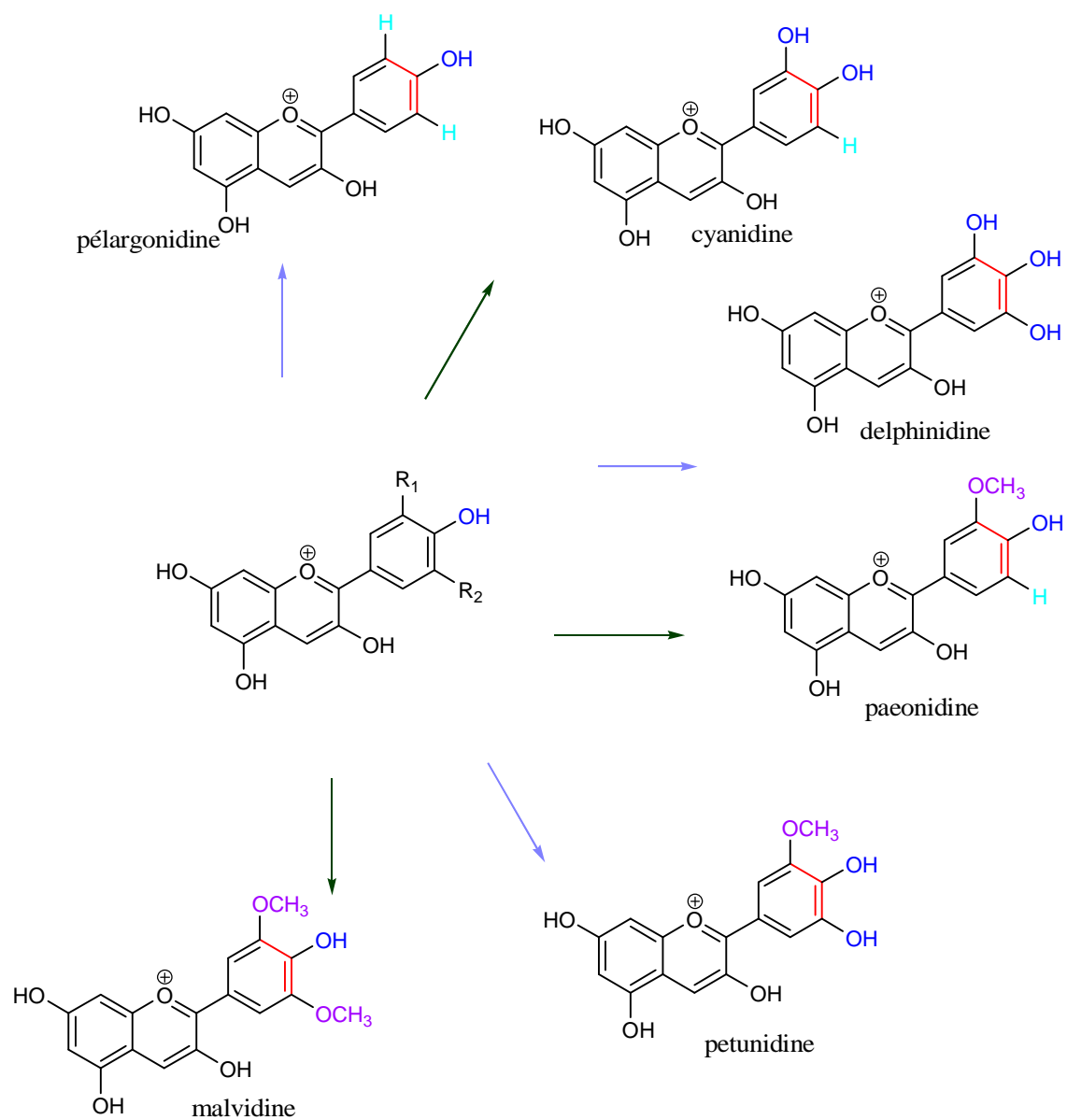


Figure I-6 : définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.

Les isoflavonoïdes sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses (tableau I-2), [18,19]. Ils sont responsables de la moindre prise alimentaire et de la toxicité envers *Trichoplusia ni* (lepidoptera : noctuidae) s'alimentent sur soja [20]. Certains isoflavonoïdes fonctionnent comme des phytoalexines, synthétisées comme défense contre le stress (microorganisme infectieux, froid, UV) [21]. Ils sont peu toxiques envers les mammifères mais très toxiques pour les poissons et les insectes. Leur toxicité est liée à l'inhibition de l'oxydation mitochondriale (transport d'électrons) [22].

Les anthocyanidines pigments vacuolaires rouges ou bleus des végétaux sont les aglycones des anthocyanes. Plus le nombre de substituants du cycle B des aglycones est grand, plus la coloration bleue est intense (dephinidine, figure I-7). la méthylation des groupements hydroxyles conduit au contraire au rouge (malvidine, figure I-7) pour les anthocyanes, d'autres facteurs interviennent pour déterminer les tons, en particulier la formation des chélates avec des ions métalliques et la formation simultanée de complexes de haut poids moléculaire, les chromosaccharides. Ces composés colorés facilitent la pollinisation en attirant les abeilles (par absorption des UV) et la dispersion des fruits par les insectes et les animaux [15,23].

**Figure I-7** : exemples d'anthocyanidines

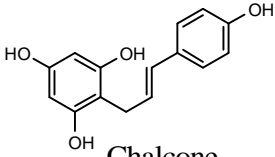
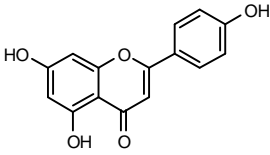
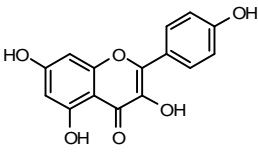
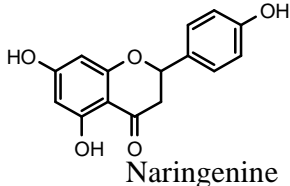
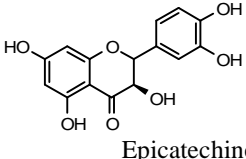
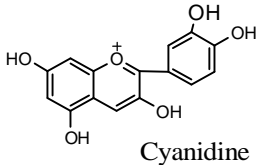
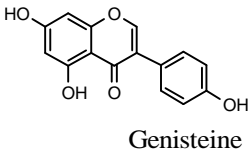
	Structure	Exemple	Sources principales de nourriture
Chalcones	 <p>Chalcone</p>	Xanthohumol et dehydrocyclo-xanthohumol hydrate	Houblon, Bière
Flavones	 <p>Apigenine</p>	Acacetine Apigenine Baicaleine Chrysin Diosmetine Luteoline Tangeretine	Persil, Thym, Celri Poivrons doux rouge Miel, propolis
Flavonols	 <p>Kaempferol</p>	Galangine Kaempferol Morine Myricetine Quercetine	Oignons, Choux frisés, Broccoli, Pommes, Cerises, Baies, Thé, Vin rouge
Flavanone	 <p>Naringenine</p>	Eriodictyol Hesperetine Homooeriodictyol Naringenine	Citrons
Flavanols	 <p>Epicatechine</p>	Catechine Epicatechne Proanthocyanidine	Cacao, Thé vert, Chocolat, Vin rouge Aubepine, Myrtille, Autres herbes
Anthocyanines	 <p>Cyanidine</p>	Cyanidines	Cerises, Raisins, Baies, Choux rouge
Isoflavones	 <p>Genisteine</p>	Biochanine A Genisteine Diadzeine Equol Formonontine	Trefle violet, Luzerne, pois, soja, Autres legumineuses

Tableau I-2: les principales sources de nourriture des 6 sous -groupes principaux de flavonoides

a- Intérêt thérapeutique des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être intéressants puisque quelques uns d'entre eux sont utilisés en pharmacie pour leurs effets anti-inflammatoires et anti-spasmodiques ou en cosmétologie comme c'est le cas de certains composés dérivés essentiellement de la lutéoline pour réduire l'hyperpigmentation de la peau [14,17].

L'industrie alimentaire utilise elle aussi ce genre de produits comme antioxydants et inhibiteurs d'enzymes [1, 17,25].

En plus de ce qui a été décrit ces dernières années, plusieurs travaux de recherche ont porté sur les flavonoïdes pour leur propriétés anti-inflammatoire, anti-allergique, et leurs effets hépatoprotecteurs [23], anti-viraux [26-28] et anti-tumoraux [29,30]. Une étude de relation structure-activité a été effectuée ainsi qu'un éventuel mécanisme d'action [31-34].

b- La biosynthèse des flavonoïdes

La formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydrocynamique, en générale le p-coumaroyl-CoA. le produit de la réaction est une chalcone, ce dernier est considéré comme le point de départ pour synthétiser les différents classes de flavonoïdes. La glycosylation et l'acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent *in vivo* [24]. La biosynthèse de ces composés est détaillée dans la figure I-8.

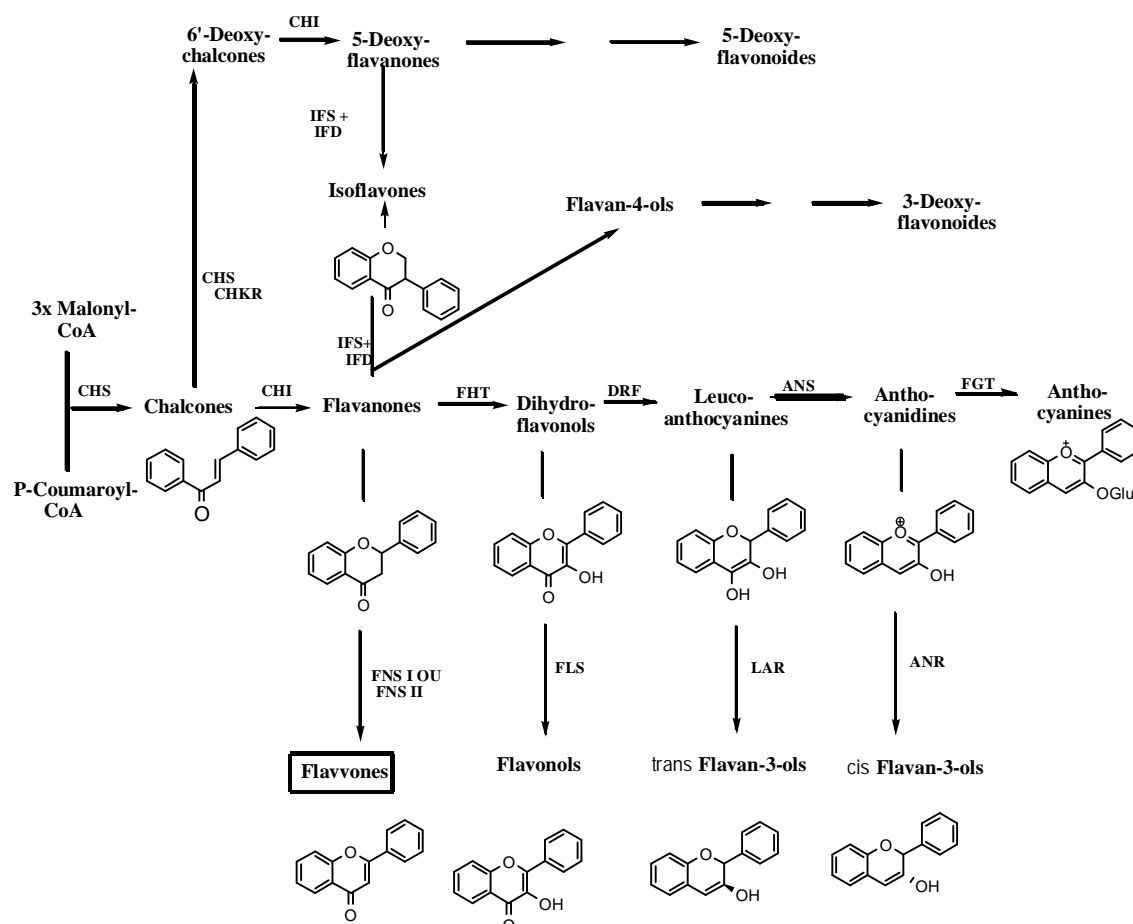


Figure I-8 : schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes : CHS, chalcone synthase ;
 CHKR, chalcone polyketide reductase ; CHI ,chalcone isomerase ; FHT, flavone 3- β hydroxylase ; DFR , dihydroflavonol 4-reductase ; ANS, anthocyanidine synthase ;
 FGT, flavonoïde glycosyltransferase ; FNS, flavonsynthase ; FLS, flavonol synthase ; LAR, leucoanthocyanidine reductase ; ANR, anthocyanidine reductase ; IFS, isoflavone synthase ; IFD, isoflavone hydratase

III- méthodes de séparation et de purification

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

Il existe plusieurs méthodes de séparation chromatographique en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode. On peut envisager une chromatographie sur colonne (C.C), sur couche mince (C.C.M) ou sur papier (C. papier). Enfin, on peut considérer également la chromatographie liquide à haute pression (C. L. H. P) et la (C. P. G), qui se présentent comme étant des techniques instrumentales basées sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique.

a- Chromatographie sur colonne (C. C)

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la C. C peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes.

Dans notre cas, il a été question d'une CC de gel silice 60 utilisée en premier lieu, elle permet de dégraisser l'extrait, d'éliminer les pigments chlorophylliens et autre produits ne faisant pas l'objet de ce travail et bien sûr dans la mesure du possible, départager le tout en bloc de composés plus en moins similaires.

b- La chromatographie sur papier (C.P)

Il s'agit de la méthode chromatographique la plus ancienne permettant de séparer des mélanges complexes de composés polaires [35], comme les glycosides. Encore aujourd'hui, malgré l'avènement de technique de purification de pointe (CLHP), la chromatographie sur papier Wattman reste couramment employée, en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de son efficacité de séparation. La CP sert à la fois de technique d'analyse et de méthode de purification des composés présents dans un extrait végétal.

c- Chromatographie sur couches minces (C.C.M)

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre (20x20 cm) ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu. En effet , lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique utilisée sous sa forme préparative, est souvent très avantageuse car la transposition à partir de C.C.M analytiques est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures . cette méthode permet la plupart du temps d'obtenir des produits purs.

L'application de ces techniques chromatographiques, d'une manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts (purs et propres) pour l'opération d'identification structurale.

IV - Méthodes d'analyses structurales

Afin d'arriver à identifier les produits isolés, une série de méthodes est utilisée et appliquée en fonction de la nature de ces produits. Ainsi, pour les flavonoïdes, les valeurs des R_f dans des systèmes de solvants connus et la fluorescence du produit en question permettent d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément la suite des opérations. Ces trois opérations sont appliquées d'une manière systématique pour ce genre de produits naturels avant même les analyses physiques proprement dites et qui sont par ordre d'utilisation, la spectrophotométrie UV-visible, la

spectrométrie de Masse et la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire.

a- **Facteur de retardement (R_f)**

Les indications que peuvent apporter ces deux propriétés constituent pour tout phytochimiste qui s'intéresse aux structures des flavonoïdes un atout considérable.

En effet, alors que la fluorescence permet de distinguer un flavone d'un flavonol, les valeurs des R_f effectués sur des systèmes chromatographiques spécifiques ou conventionnels peuvent si elles sont bien utilisées, apporter beaucoup d'indications. Ce dernier point permet effectivement de classer les composés à analyser selon la nature des substituants présents sur ces squelettes tableaux I-3.

La valeur de R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

Structure flavonique	Facteur de retention
-Augmentation des groupes hydroxyles	- R_f diminue dans le solvant organique
-Methylation des hydroxyles	- R_f augmente dans le solvant organique et diminue dans le solvant aqueux
-Glycosylation	- R_f augmente dans le solvant aqueux - R_f diminue dans le solvant organique
-Acylation	- R_f augmente dans le solvant organique - R_f diminue dans le solvant aqueux

Tableau I-3 : Relation R_f -structure flavonique

b-La spectrophotométrie UV-visible

La spectroscopie dans l'ultraviolet constitue une technique majeure de détection, de contrôle de pureté et d'information des composés phénoliques. En particulier, les flavonoïdes, en milieu méthanolique, sont caractérisés par deux bandes d'absorption (bande I, entre 330 et 550 nm; bande II, entre 240 et 285 nm). Ces deux bandes sont attribuables au fait que les flavones et flavonols présentent des formes limites de type cinnamoyle ou benzoyle (figure I-9). La position précise et les intensités relatives des maximums d'absorption fournissent des renseignements précieux sur la nature du flavonoïde et de sa substitution tableau1-4. En règle générale l'addition d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'onde), pour une méthylation ou glycosylation des groupements 3, 5 et 4' hydroxylés, un déplacement hypsochrome est noté pour la bande I. Outre la caractérisation du spectre d'absorption du produit, généralement dans du MeOH, des informations additionnelles importantes peuvent être obtenues par l'utilisation de réactifs de déplacement (section II ci-après). Ceux-ci complexent de manière variable les composés phénoliques en solution et provoquent des déplacements caractéristiques des maxima. Ceux-ci peuvent être interprétés et fournir de nombreux renseignements sur la substitution des différentes positions sur les noyaux A et B du flavonoïde. Le tableau I-5 résume les informations structurales qui peuvent être obtenues en utilisant les différents réactifs de déplacement, dans le cas des flavonols et des flavones [35-37].

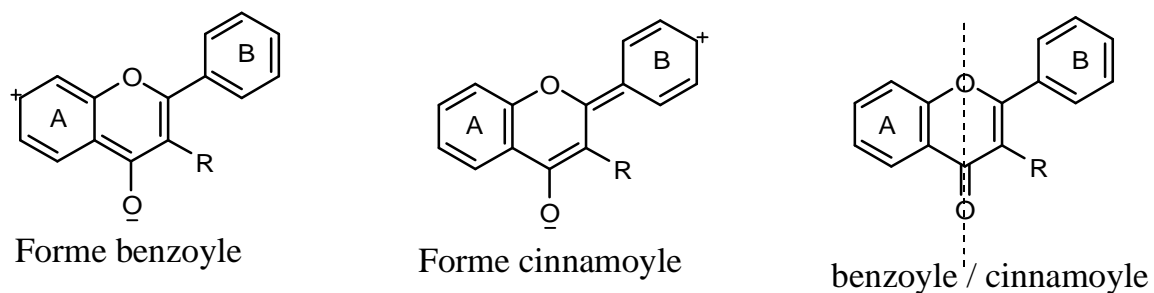


Figure I-9 : les formes limites des flavones et flavonols

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Type de flavonoïdes
250 - 280	310 - 350	Flavone
250 - 280	330 - 360	Flavonol(3-OH substitué)
250 - 280	350 - 385	Flavonol (3-OH libre)
245 - 275	310 - 330 épaulement pic à 320	Isoflavone Isoflavone (5-deoxy-6,7-dioxygéné)
275 - 295	300 - 330 épaulement	Flavone et dihydroflavonol
230 - 270 intensité faible	340 - 490 380 - 430	Chalcone Aurone
270 - 280	465 - 560	Anthocyane et anthocyanidine

Tableau I-4 : Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV pour les différentes classes de flavonoïdes

REACTIFS	DEPLACEMENT EN (NM)		INTERPRETATION
	Bande I	Bande II	
MeOH	310 - 350	250 - 280	Flavones
	330 - 360	250 - 280	Flavonols (3-OH substitué)
	350 - 380	250 - 280	Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+40 à 60 avec stabilité d'intensité		4' - OH
	+50 à 60 avec diminution d'intensité		3 OH et 4' OR
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4' - OR
	Apparition d'une 3 ^{ème} bande entre BI et BII		7 - OH
	Absence de bande entre 320 - 335		7 - OR
	Transformation de bande I en une inflexion		5 - OH (seule hydroxyle libre)
AlCl ₃ / MeOH	+20 à 45 +60		5 - OH 3 - OH
AlCl ₃ +HCl/ AlCl ₃	-30 à -40		Ortho di OH sur le noyau B
	-20 à -25		Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)
AlCl ₃ +HCl/ MeOH	+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60		5 - OH 5 - OH(avec 6-oxygénation) 3 - OH ou 3 - OH et 5 - OH
NaOAc/ MeOH	+5 à 20		7 - OH
	Déplacement très faible		7 - OR
	Diminution d'intensité avec le temps		6,7; 7,8 ou 3',4' di OH
	le spectre se décompose avec le temps		5,6,7 ; 5,7,8 ou 3,3',4' -triOH
NaOAc+ H ₃ BO ₃	+12 à 36		3',4' di OH
	+5 à 10		6,7 ou 7,8 diOH

Tableau I-5 : Informations structurales provenant des déplacements induits par les réactifs

b₁- Protocole :

Préparation de la solution du produit purifié et des réactifs de déplacement:

Une petite quantité du produit est diluée dans du MeOH jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Les réactifs de déplacement sont préparés comme suit [36 .37]:

- solution aqueuse de soude à 0.5 N
- chlorure d'aluminium (AlCl₃): 5 g d'AlCl₃, anhydre frais est délicatement dissous dans du MeOH (100 ml).
- acide chlorhydrique conc. (HCl): 50 ml d'HC1 37% de concentration est dilue dans 100 ml de H₂O.
- acétate de sodium (AcONa): anhydre en poudre.
- acide borique (H₃BO₃): solution aqueuse à 5%.

(NB: tous les produits utilisés sont de qualité analytique).

b₂ -Lecture des spectres:

- Le spectre du flavonoïde pur dilué est mesuré (spectre "MeOH").
- Quelques gouttes de solution de NaOH 0.5 N sont ajoutées dans la cuve contenant le flavonoïde dans le méthanol et après homogénéisation, le spectre "MeONa" est enregistré. Le spectre MeONa" est relu après 5 minutes afin de vérifier toute décomposition de la molécule phénolique.
- Dans une autre cellule contenant le flavonoïde dilué, 5 gouttes de AlCl₃, sont Additionnées, l'échantillon mélangé et le spectre "AlC₃; enregistré ; 3 à 5 gouttes de HC1 sont ensuite ajoutées et le spectre "AlC₁₃/HCl" mesuré.
- Quelques grains de AcONa sont ajoutés au flavonoïde dilué jusqu'à saturation. le spectre "AcONa" est mesuré. Enfin, le spectre "AcONa/ H₃BO₃," est enregistré après addition de quelques gouttes à 5% de H₃BO₃ et homogénéisation, le spectre est enregistré.

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

b₃- Interprétation des spectres:

Les spectres UV enregistrés dans le MeOH permettent de déterminer à quelle classe de flavonoïdes appartient chacun des composés purifiés. Les déplacements des maxima provoqués par les différents réactifs sont interprétés en se basant sur les informations disponible tableau I-5.

c- La Spectrométrie de Masse (SM)

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [38], les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements sur la séparation des substituants entre le noyau A et le noyau B. Cette technique connaît actuellement un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse de structures glycosylées tels que la FAB, l'électrospray utilisée comme détecteur en CLHP. En couplage avec la RMN celle-ci permet des analyses très rapides et très rigoureuses.

d- La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Elle permet de connaître :

- le nombre de sucres liés à l'aglycone et la nature de leur liaison (α ou β)
- la position et le nombre de substituants méthoxyles sur le squelette flavonique [39.40]. Concernant ces données, quelques déplacements chimiques des protons des noyaux A et B sont reportés dans le tableau I-6. [41].

Proton du noyau A Nature du flavonoïde	H ₅		H ₆		H ₈	
	δ, ppm	J,Hz	δ, ppm	J,Hz	δ, ppm	J,Hz
5, 7 -OH	/		6,0-6,2 d	2,5	6,3-6,5 d	2,5
5-OH; 7-OR(R=Glc)	/		6,2-6,4 d	2,5	6,5-6,9	2,5
7-OR(R=H,sucre)	8,0 d	9,0	6,7-7,1	2,5-9,0	6,7-7,0	2,5
5,6,7-OR (R= H,sucre) 5,7,8-OR	/		6,3 s		6,3 s	
Proton du noyau B	H _{2'} , H _{6'}		H _{3'} , H _{5'}		/	
Flavone(4'-OR)	7,7-7,9 d	8,5	/		/	
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1 d	8,5	/		/	

Tableau I-6 : quelques déplacements chimiques des protons des noyaux A et B

Comme nous l'avons vu, le premier chapitre est consacré à la présentation de la classe des composés phénoliques largement représentée dans la famille des Globulariacées. Une description des différents modèles structuraux présents, est donnée en insistant sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques ainsi que sur leur schéma de biogenèse. Dans le deuxième chapitre nous allons aborder la famille des Globularicées.

References Bibliographiques

- [1] Gorham, J. Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea, *Phytochemistry* 1977 vol. 16, p. 249-253
- [2] Rice, E. L. *Allelopathy*. New York: Academic press 1974
- [3] Harborne, J. B. *Introduction to ecological biochemistry*. London: Academic Press 1977
- [4] Swain, T. Secondary compounds as protective agents, *Annu, Rev. Plant Physiol.* 1977 vol. 28, p. 479-501
- [5] Isman, M. B. and Duffy, S. S. Toxicity of tomato phenolic compounds to fruitworm *Heliothis Zea*. *Entomol. Exp Appl.* 1982 vol. 31, p. 370-376
- [6] Harborne, J. B. and Ingham, J. L. Biochemical aspects of the coevolution of higher plants with their fungal parasites In *Biochemical aspects of plant and animal coevolution annual proc. Phytochem. Soc. Europe*, ed. H. J. B(ed): Academic press 436 p., 1978, p. 343-405
- [7] Harborne, J. B. *Introduction to ecological biochemistry*. New York: Academic Press. 1988
- [8] Griffiths, D. W. Condensed Tanins In *toxic substances in corp plants*, (eds J. P. F. D'Mello C. M. Duffus and J. H. Duffus° Cambridge: the Royal Society of Chemistry. 1991, p. 180-201
- [9] Gilbert, B. L. and Norris, D. M. Achemical basis for bark beetle (*scolytus*) distinction between host and non-host trees. *J. Insect physiol.* 1968 vol. 14, p. 1063-1068
- [10] Murry, R. D. H. , Mendez, J. and Brown, S. A. *the natural coumarins*. Chichester, UK: John Wiley and Sons. 1982
- [11] Berenbaum, M. Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. *Evolution* 1983 vol. 37, p. 163-179
- [12] Berenbaum, M. Coumarins In *Herbivores: their interactions with secondary plant meabolites.* , (eds. G. A. Rosanthal and M. R. Berenbaum) New York: Academic Press. 1991 vol. I, p. 221-249.
- [14] Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983; 32:1141-8.
- [15] Middleton Jr. E., Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall; 1993.
- [16] Grange J.M, Davey R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* 1990; 83:159-60.
- [17] Harborne J.B., Baxter H. *The handbook of natural flavonoids*, Vols 1 and 2. Chichester,

UK: John Wiley and Sons; 1999.

- [20] Neupane, F. P. and Norris, D. M. Indo-acetic acid alteration of soybean resistance to the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 1990 vol. 19, p. 215-221
- [21] Perrin, D. R. and Cruickshank, I. A. M. Studies on the phytoalexins. VII. Chemical stimulation of pisatin formation in *Pisum sativum*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1965 vol. 18, p. 803-816
- [22] Panda, N. and Khush, G. S. Secondary plant metabolites for Insect resistance. In *Host Plant Resistance to insects*. Wallingford, UK: CAB International, 1995, p. 22-66
- [23] Skibola C.F., Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:375–83.
- [25] Benelli, R., Vene, R., et al., 2002. Anti-invasive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a natural inhibitor of metallo and serine proteases. *Biological Chemistry* 383 (1), 101–105.
- [26] Afolayan, A.J., Meyer, J.J., The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol* 1997; 57:177–81.
- [27] Li, B.Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J.A., Ruscetti, F.W., Wang, J.M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:534–8.
- [28] Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Baylor, N.W., Ruscetti, F.W., Kung, H.F. Inhibition of HIV infection by baicalin — a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39:119–24.
- [29] Canivenc-Lavier, M.C., Vernevaut, M.F., Totis, M., Siess, M.H., Magdalou, J., Suschetet, M., 1996. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology* 114, 19–27.
- [30] Shih, H., Pickwell, G.V., Quattrochi, L.C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 287–294.
- [31] Tsao, T.F., Newman, M.G., Kwok, Y.Y., Horikoshi, A.K. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res* 1982 ; 61:1103–6.
- [32] Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., et al. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:374–80.
- [33] Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, Hayashi T. Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. *J Nat Prod* 1999; 62:1595–9.
- [34] Iniesta-Sanmartin E, Tomas-Barberan FA, Guirado A, Tomas-Lorente F. Antibacterial

flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Med* 1990; 56:648–9.

- [35] K. R. Markham, Flavone, flavonols, and their glycosides, in “methods in plant biochemistry”, (P. M. Dey and J. B. Harborne), 1989, p. 197-232. Academic press.
- [36] T.J. Mabry, Markham, K.R., and Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*, 1970, p. 12 et 35-230. Springer-Verlag, New York. Heidelberg. Berlin.
- [37] K.R. Markham, (1982). *Techniques of Flavonoid identification*. London: Academic Press.
- [38] Nielsen, J.G. et Moller, J. *Acta. Chem. Scand*, 1970, 24, 2665.
- [39] Wilson, R. G. , Bouvie, J. H. , et Williams, D. H. *tetrahedron*, 1986, 24, 1407.
- [40] Rodriguez, E., Carman, N. J., et Mabry, T. J. *Phytochemistry*, 1972, 11, 409.
- [41] Markham, K. R., et Geiger, H. H^1 NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides, in *hexadeuterodimethylsulfoxide*. In *the flavonoids*, 1994, edited by Harborne, J. B., 1993, Chapman and Hall, London.

La famille Globulariacées

II-1-Description Botanique

II-1-1Introduction :

La famille des Globulariacées comprend deux genres dont *globularia* et *poskea* ; et environ trente espèces répandues en Europe et le nord Africain [1.2].

II-1-2-Taxonomie :

ENBRANCHEMENT	→	ANGIOSPERME
CLASSE	→	DICOTYLIDONE
SOUS CLASSE	→	ASTERIDAE
ORDRE	→	SCROPHULARIALES
FAMILLE	→	GLOBULARIACEAE

II-1-3-Aspect botanique et répartition géographique

Les plantes du genre *globularia* sont vivaces, à feuilles alternes, dont les fleurs sont groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées. Les fleurs ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée. Elles sont en général bleues. A Quatre étamines. Le fruit est un akène entouré par le calice persistant (figure II-1) [1]. On trouve en Algérie, *Globularia alypum*, *G. vesceritensis* Batt. et *G. eriocephala* Pomel. Les deux dernières sont présentes dans le Sahara central (Hoggar, Tassili) [2]. Le tableau II-1 représente quelques espèces et leur répartition géographique.

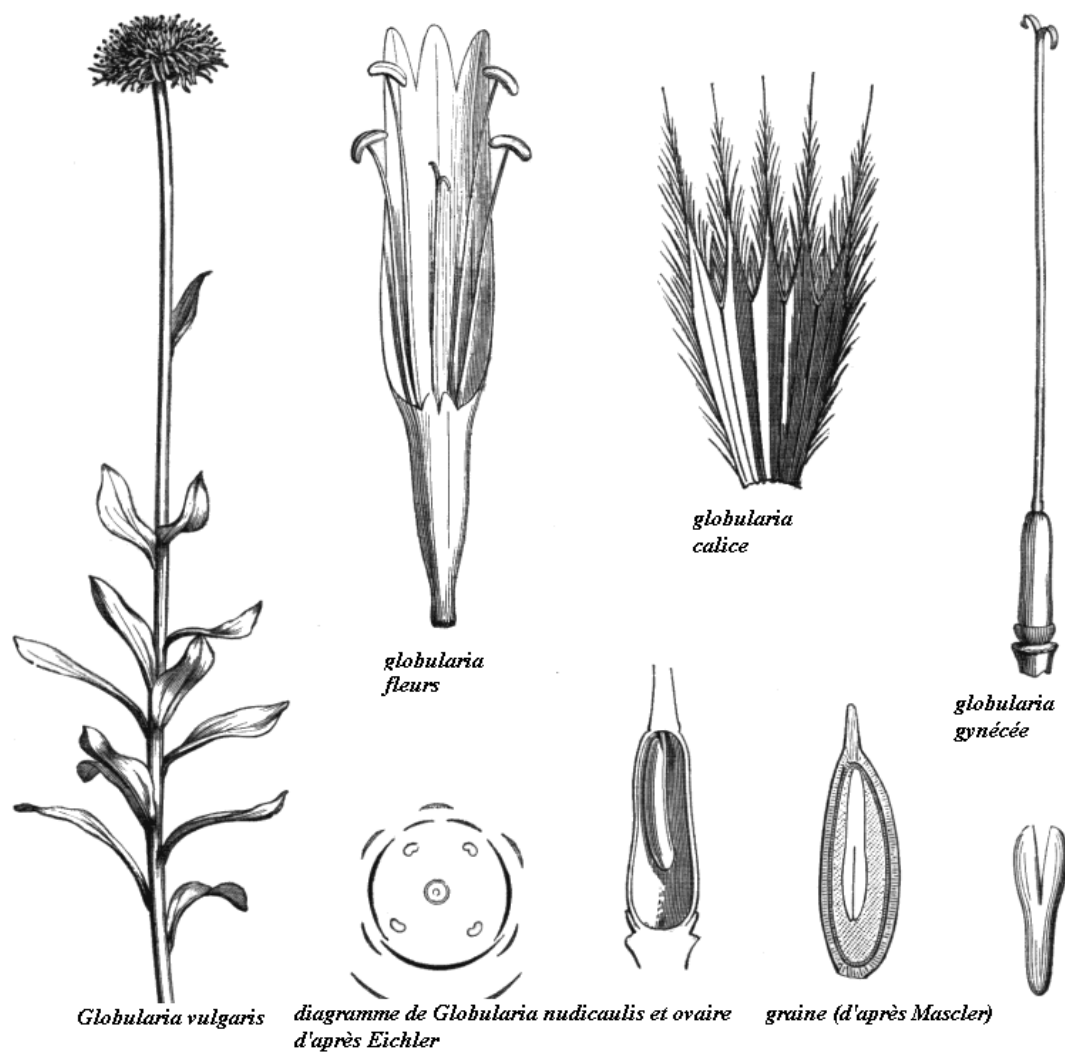


Figure II-1 : Globulariacée

ESPECE	SYNONYMES	ASPET BOTANIQUE	REPARTITION GEOGRAPHIQUE
Globularia alpina Salisb	globularia vulgaris L. globularia bisnagarica L. globularia caespitosa Orteg globularia collina Salisb. globularia linifolia Lam. globularia pungens Pourr. globularia linnaei Rouy globularia multicaulis Tenore globularia nudicaulis Herb. Linn. globularia elongata Hegetschw.	Vivace de 10 à 20 cm de haut, floraison d'un bleu vif en été	Europe de l'Espagne jusqu'au Caucase
Globularia aphyllanthes Crantz	globularia punctata Lapeyr. globularia willkommii Nym.	Vivace d'environ 30 cm de haut touffe évasée, arrondie, floraison bleu indigo en été	Europe méridionale
Globularia amygdalifolia Webb	—	espèce protégée car elle est en voie de disparition -endémique	Ile San Nicolau
Globularia ascanii Bramwell and Kunkel	—	—	Iles Canaries
Globularia cambessedii Willk.	—	Vivace de 30 cm de haut en situation aride, floraison bleue en été	Iles Baléares
Globularia cordifolia L.	globularia bellidifolia Salisb. globularia ilicifolia Willk. globularia minima Vill. globularia spinosa Lam. globularia saxatilis Salisb. globularia valentina Willk.	feuilles étroites à la base des tiges ligneuses. Les feuilles radicales forment des rosettes touffe, érigé floraison violette en été	les Alpes du Sud-Est Asie mineure
Globularia davisiana O. Schwarz	—	sous arbrisseau de 30 cm de haut floraison bleue en été	Asie mineure en altitude
Globularia dumulosa O. Scharz	—	10 cm de haut environ	Asie mineure en altitude
Globularia eriocephala Pomel	—	tige dressée à feuilles progressivement réduites	en Afrique du nord Algérie
Globularia fuxcansis Giraudias ou globularia fuxeensis	—	—	Sud de l'Europe en altitude vers 1000 m surtout en Espagne
Globularia gracilis Rouy et Richter ex globularia grèle	—	Entre 8 et 15 cm de haut, touffe érigé floraison d'un bleu lavande	Sud de l'Europe (Pyrénées)
Globularia hedgei H. Duman	—	—	Asie mineure en altitude (Turquie)
Globularia incanescens Viv	globularia glauca Balb ex Steud	Sous arbrisseau rampant de 5 à 10 cm de haut à floraison bleue pâle en été	Sud de l'Europe en altitude (France, Italie, Alpes)

Tableau II-1 : Quelques espèces de la famille globulariaceae et leur répartition géographique

ESPECE	SYNONYMES	ASPET BOTANIQUE	REPARTITION GEOGRAPHIQUE
<i>Globularia indubia</i> (Svent.) Kunkel	<i>lytanthobularia indubia</i> Svent	—	Iles Canaries endémique
<i>Globularia lippiaefolia</i> Pau	—	—	Espagne (Pyrénées)
<i>Globularia liouvillei</i> Jahandiez et Maire	—	—	En altitude plus de 2000 m dans le haut-atlas région de oukaïmeden (maroc)
<i>Globularia majoricensis</i> Gand.	—	—	Iles Baléares (Mallorque)
<i>Globularia neapolitana</i> O. Schwarz	—	sous arbrisseau	Europe de sud (Italie région de Naples)
<i>Globularia nana</i> Lam.	<i>globularia bellidifolia</i> Tenore <i>globularia repens</i> Lam.	sous arbrisseau de très petite taille 5 cm maximum, floraison bleu lavande à bleu lilas	Asie et Europe en altitude des Alpes jusqu'au Balkans
<i>Globularia nudicaulis</i> L.	—	Sous arbrisseau de 20 à 30 cm de haut	France Alpes - Pyrénées- Espagne dans les pyrénées et en navarre
<i>Globularia orientalis</i> L.	—	Sous arbrisseau de environ 10 à 25 cm de haut, floraison fin printemps-été	Asie mineure en altitude (Turquie-région d'Ankara Syrie)
<i>Globularia oscensis</i> Coincy	—	—	Sud d l'Europe (Iles canaries-Grande Canarie)
<i>Globularia pallida</i> K. Koch	<i>globularia ttrichosantha</i> Fish et Mey	—	ouest de la Turquie dans la province de Bilecik-Syrie
<i>Globularia procera</i> Salisb	<i>globularia longifolia</i> Ait. <i>globularia salicina</i> Lam. <i>globularia macrantha</i> K. Koch ex Walp.	—	Ile de Madèrne et Ile de Ténérife
<i>Globularia sintensisii</i> Hausskh. et Wettst. ex Wettst	—	Sous arbrisseau de 10 à 20 cm de haut ,floraison bleue en été	En altitude (Iraque - Kurdistan- Turquie)
<i>Globularia sarcophylla</i> Svent.	—	10 à 20 cm de haut , touffe évasée	Endémique aux Iles Canaries
<i>Globularia stygia</i> Orph.	—	Vivace de 5 à 20 cm de haut en situation aride , floraison en été	Grèce

Suite tableau II-1 : Quelques espèces de la famille globulariaceae et leur répartition géographique

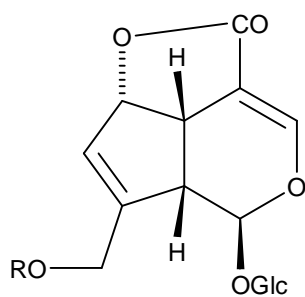
II-2-Usages traditionnels et activités biologiques

Depuis des millénaires, les plantes de genre *globularia* sont utilisées en médecine traditionnelle Turque, pour leurs effets laxatifs et diurétiques [3.4]. Au nord de l'Afrique elle est utilisée pour calmer les douleurs et pour traiter les douleurs rhumatismales [5]. Des études bibliographiques confirment que les espèces du genre *globularia* présentent des activités anti-microbiennes, cytotoxiques, cytostatiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires [6].

II-3-Études chimiques antérieures sur le genre

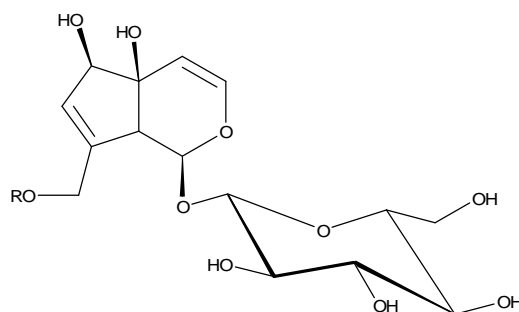
La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés de genre *Globularia*. Ce sont essentiellement des flavonoïdes et des phényléthanoïdes. Ces composés sont des glycosides du phényléthanol estérifié par l'acide cinnamique (ex. acide caféique, férulique, p-coumarique). Ils ont un effet inhibiteur sur les enzymes 5-lipase oxygénase, aldose réductase et sur les protéines kinase [7, 8]. La littérature signale également leurs effets immunosuppresseurs [9], anti-inflammatoire et anti-microbien [10, 11]. Les iridoïdes glycosides constituent également des métabolites secondaires du genre *Globularia*. Ils comprennent un cyclopentane et des cycles pyraniques. Ces structures sont connues pour leurs diverses activités biologiques [12, 13].

Une étude phytochimique réalisée sur l'extrait de l'espèce *Globularia cordifolia* en 1970 par Kinzel H. et collaborateurs [14] a permis d'isoler et d'identifier un composé de type iridoïde, l'asperuloside (1)



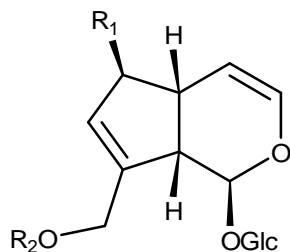
1 R= Ac

43 R= H

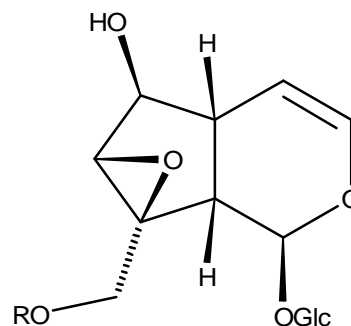


2 R= benzoyl

Une autre étude effectuée sur les parties aériennes de la même espèce [15] a révélé la présence d'un nouvel iridoïde glycosylé et acylé, appelé globularifolin (2) et cinq autres composés connus, l'asperuloside (1), l'aucubine (3), le melampyroside (4), le monomelittoside (5) et le catalpol (6).



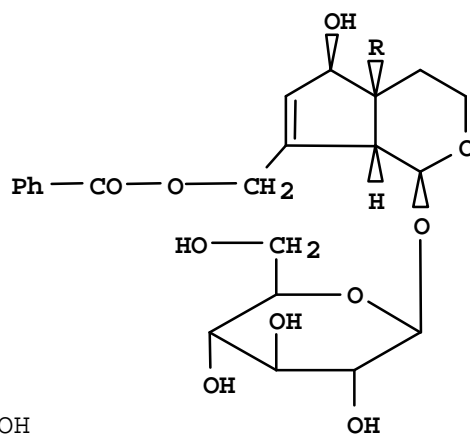
	R ₁	R ₂
<u>3.</u>	OH	H
<u>4.</u>	OH	Benzoyl
<u>5.</u>	OH	Ac



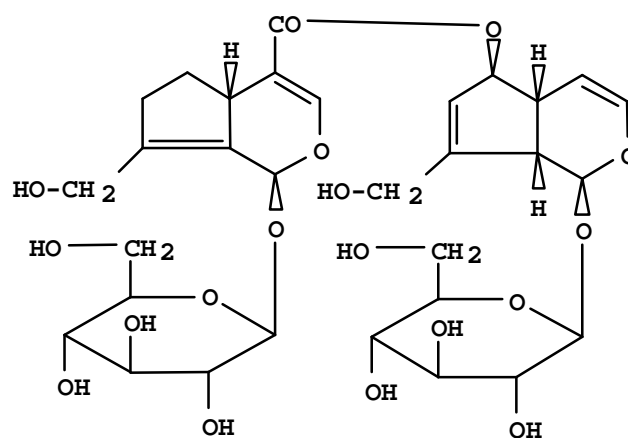
6 R= H

30 R= benzoyl

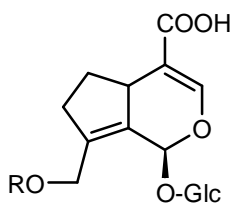
Récemment, Kirmiziberkmez H. et ces collaborateurs [16] ont isolé et identifié à partir de l'extrait méthanolique des racines de la même espèce un nouvel iridoïde glycosylé nommé, le 5- hydroxydavisioside (7) et un nouveau bisiridoïde glycosylé, le globuloside C (8) ainsi que six autres iridoïdes glycosylés connus, l'aucubine (3), le melampyroside (4), le monomelittoside (5), la globularifolin (2), l'alpinoside (9) et l'asperuloside (1)



7 R=OH
29 R=H



8

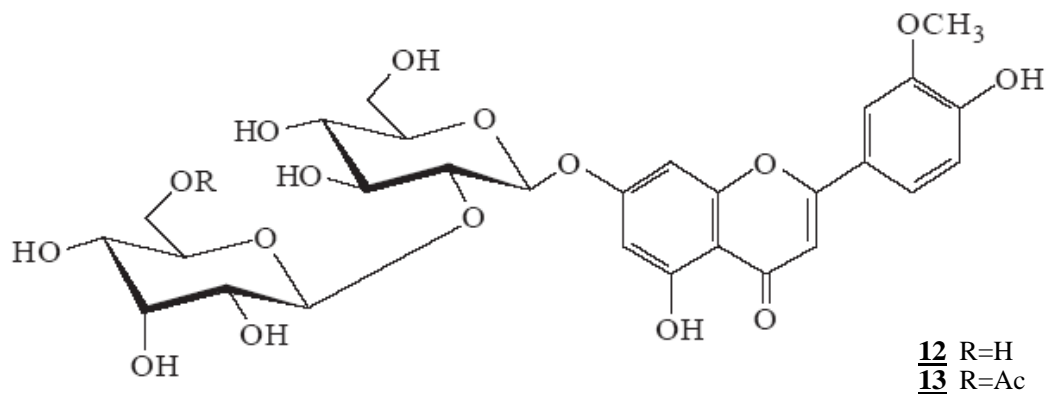
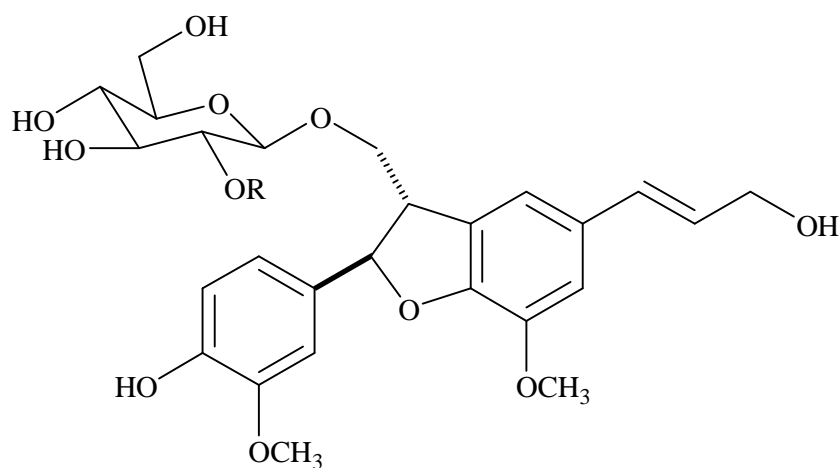


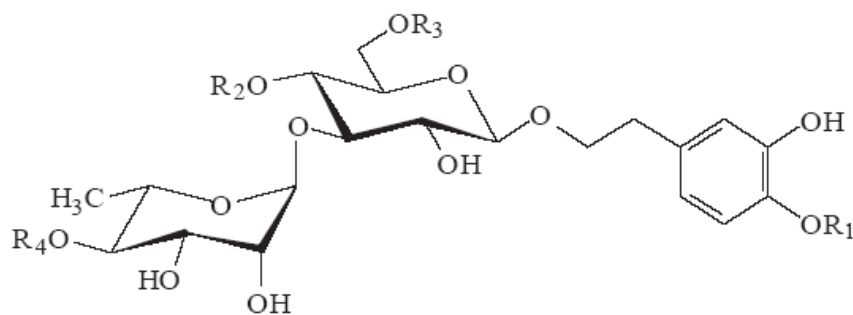
9 R= Ac

31 R=H

Une autre étude phytochimique menée par les mêmes chercheurs sur les racines de la même espèce [17] a permis d'aboutir à l'isolement d'un nouveau neolignan diglycosylé, le dehydronicoferyl alcool 9-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (10) et un neolignan glycosilé connu, le dehydronicoferyl alcool 9-*O*- β -D-glucopyranoside (11). Deux flavones glycosylées, le chrysoeriol 7-*O*- β -D-allopyranosyl-(1/2)- β -D-glucopyranoside

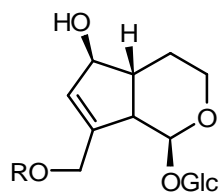
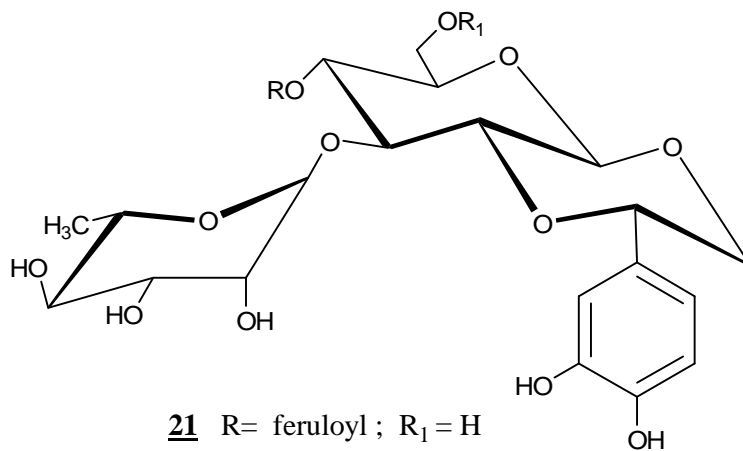
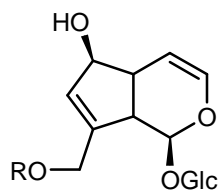
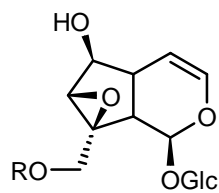
(12 et le stachyspinoside (13), ainsi que cinq phenylethanoïdes glycosylés, le verbascoside (14), l'isoverbascoside (15), le leucosceptoside A (16), le martynoside (17) et le rossicaside A (18). Les structures de ces composés ont été déterminées par les méthodes d'analyse spectroscopique (RMN 1D, 2D ; IR ; UV ; MS).

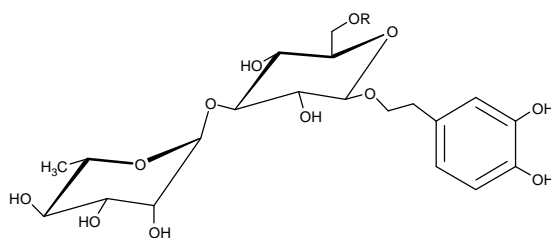




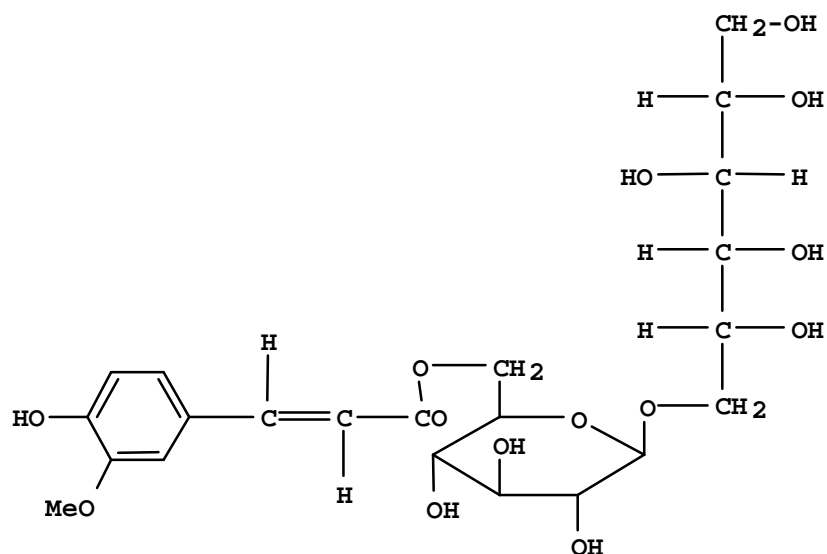
- 14** $R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=$ trans-caffeyol
15 $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=$ trans-caffeyol
16 $R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=$ trans-feruloyl
17 $R_1= CH_3$; $R_3=R_4=H$, $R_2=$ trans-feruloyl
18 $R_1=R_3 =H$; $R_2=$ trans-caffeyol ; $R_4=\beta$ -D-Glc
32 $R_1=R_2=R_3=R_4= H$

L'étude chimique de l'espèce *globularia sentensisii* réalisée par le même groupe de chercheurs sur les racines [18] a permis d'isoler et d'identifier un nouveau iridoïde glycosilé, le sintenoside (19), et deux nouveaux phenylethanoïdes glycosylés, le globusintenoside (20) (= 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl-O-6-O-feruloyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside); et le 3'''-O-methylcrenatoside (21) (= 1,2-O-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethan-1,2-diyl]-3-O- α -L-4-O-feruloyl-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranose), trois iridoïdes glycosylés connus, le lytanthosaline (22), la globularine (23) et le catalpol (6), ainsi que six phenylethanoïdes glycosylés, le verbascoside (14), l'isoverbascoside (15), le leucoscepthoside A (16), le plantainoside C (24), le martynoside (17), et l'isocrenatoside (25). Ces composés ont été caractérisés par des méthodes d'analyse spectroscopique (MS ; RMN 1D ,2D).

**19** R= trans cinnamoyl**21** R= feruloyl ; $R_1 = H$ **25** R= H ; $R_1 = \text{caffeyol}$ **40** R = caffeyol ; $R_1 = H$ **22** R= trans cinnamoyl**23** R= trans cinnamoyl

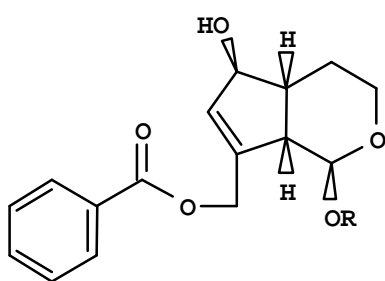
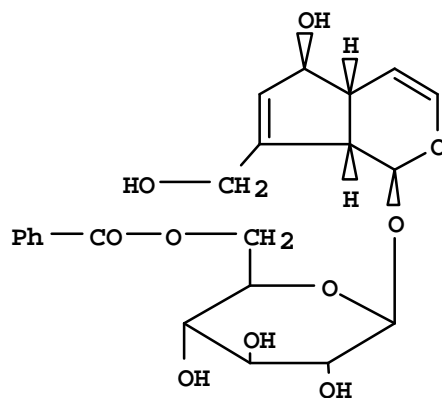
**24** R= feruloyl

Des travaux effectués sur les racines de l'espèce *Globularia orientalis* [19] ont permis d'isoler et d'identifier, un nouveau antioxydant sucre ester nommé, globularitol (**26**) (= 6-O-feruloyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-glucitol).

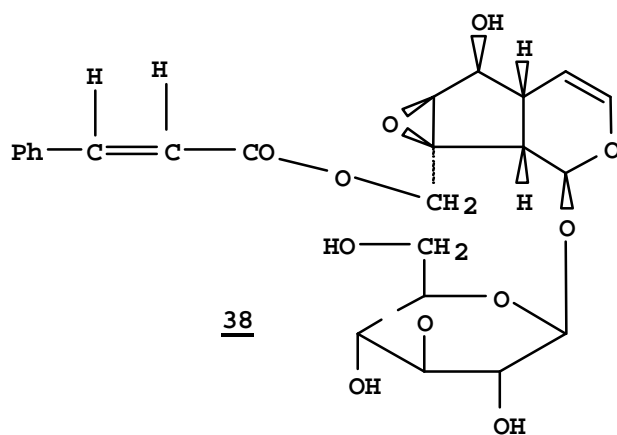
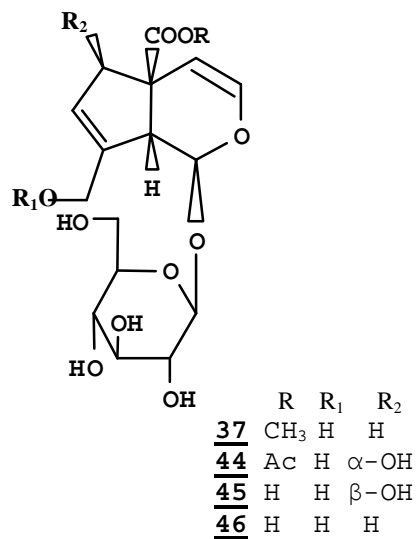
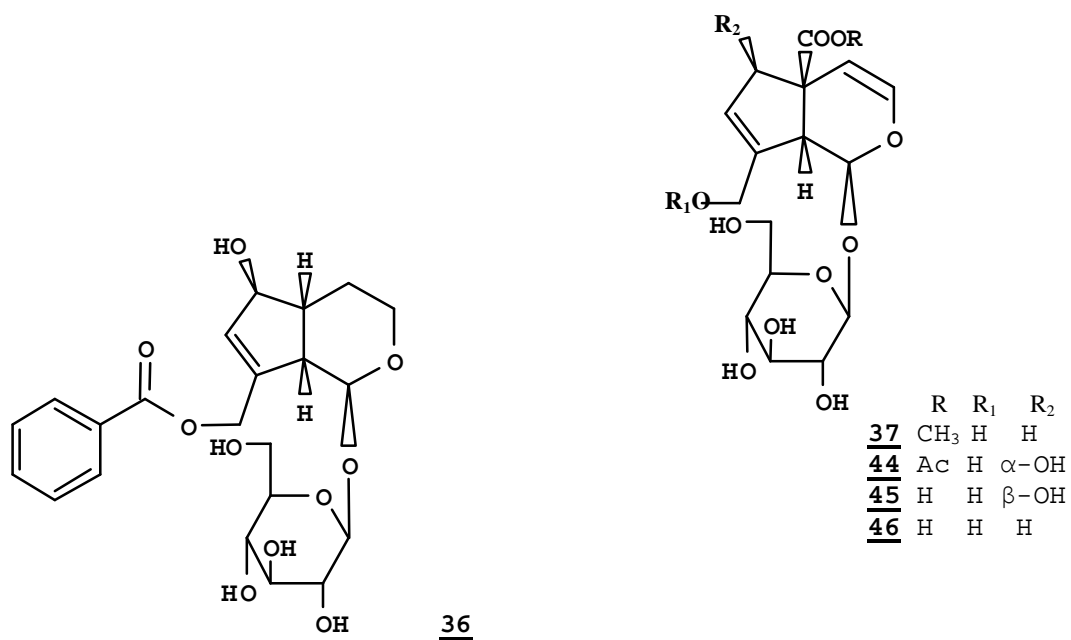
**26**

L'investigation chimique de l'extrait des parties aériennes de *G. dumulosa* [20] à révélé la présence de deux nouveaux iridoïdes, le 10-O-benzoylglobularigenin (**27**) et le dumuloside (**28**), sept iridoïdes glucosylés connus, le davisioside (**29**), l'aucubine(**3**), le melampyroside(**4**), le catalpol(**6**), le 10-O-benzoylcatalpol(**30**), l'alpinoside(**9**), et le deacetylalpinoside(**31**), et trois phenylethanoïdes glycosilés, le verbascoside(**14**), decaffeyl-verbascoside(**32**), et le leucosceptoside A(**16**), ainsi que trois flavones glucosylés, la pectolarigenin 7-O- β -D-glucopyranoside(**33**), la nepetin 7-O- β -D-

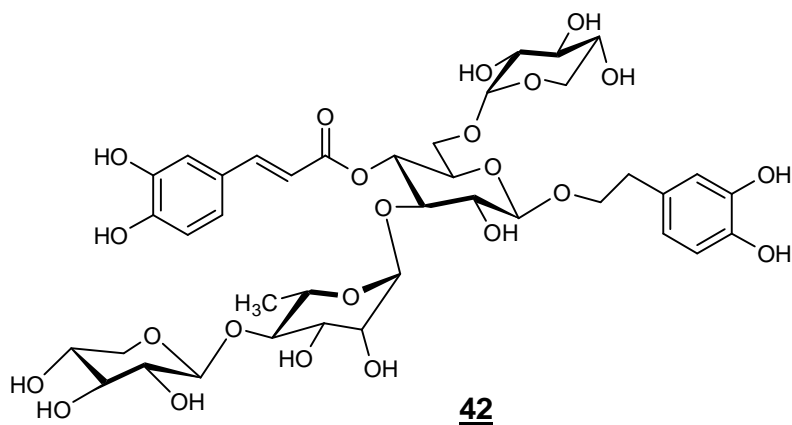
glucopyranoside(34) et la demethoxycentaureidin 7-O- β -D-glucopyranoside(35),

2728

L'étude chimique de l'extrait ethanolic des parties aériennes de *G. davisiana* [21]a permis d'isoler un nouveau iridoide glycosilé appelé, davisioside(36), et neuf autres connus : l'asperuloside(1), l'alpinoside(9), le geniposide(37), la globularine(23), la globularicisine(38), l'agnuside(39), le 10-O-benzoylcatapol(30), la lytanthosaline(22), et la melamperoside(4) et trois phenylethanoides glycosilés connus, verbascoside(14), isoacteoside(15) et le leucosceptoside(16).

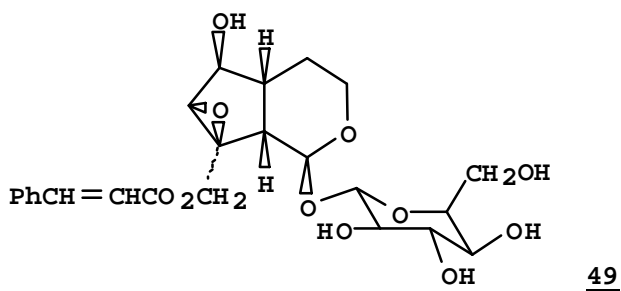
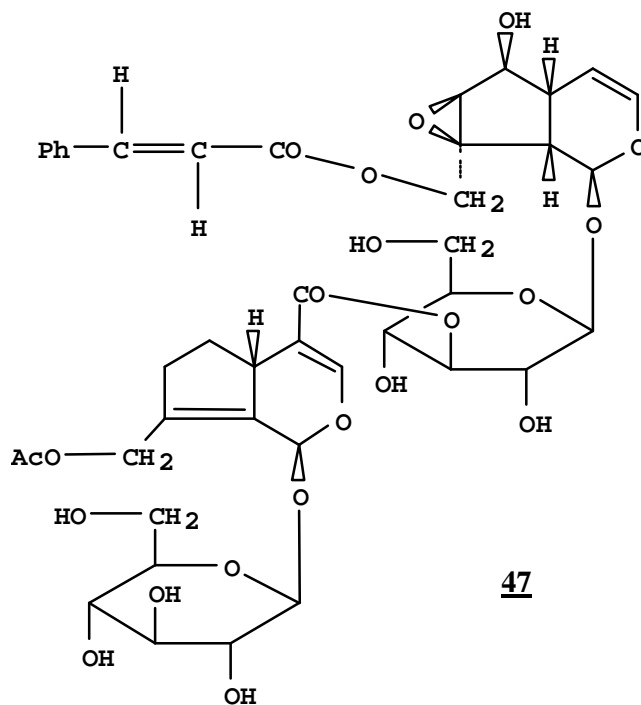
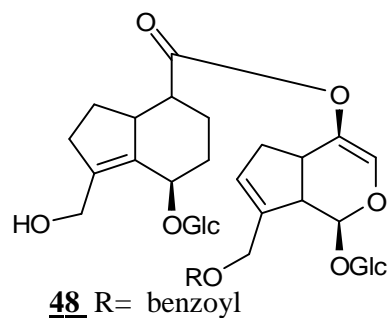


Une étude réalisée sur l'extrait des parties aériennes de *G. trichosantha* [22], a abouti à la mise en évidence cinq phenylethanoïdes glycosylés : le crenatoside (= oraposide) (40), le verbascoside (= acteoside) (14), le trichosanthoside A (= 3,4-dihydroxy- β -phenylethoxy-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside) (41), le rossicaside A (18), et le trichosanthoside B (= 3,4-dihydroxy- β -phenylethoxy-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (42). Les composés 41 et 42 étaient nouveaux.



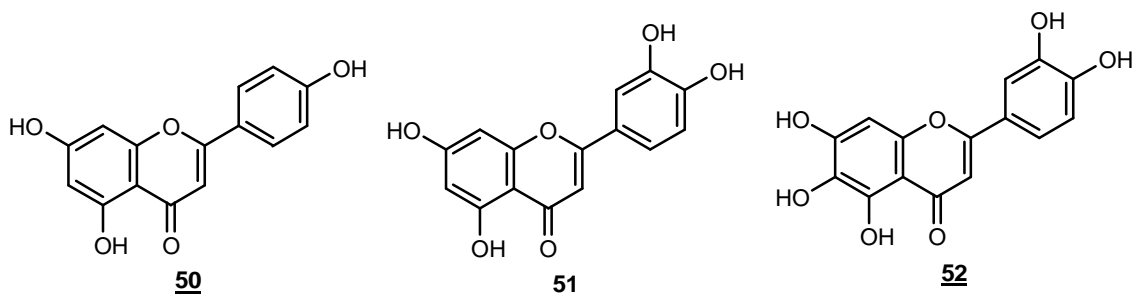
Une autre étude phytochimique de la même espèce [23] sur les parties aériennes permis d'isoler et d'identifier un nouvel iridoïde glycosilé : deacetylalpinoside (31), avec neuf iridoïdes glycosylés connus : le catalpol(6), 10-O-benzoylcatalpol(30), l'aucubine(3), l'asperuloside(1), le deacetylasperuloside(43), l'acide asperulosidique(44), le scandoside(45), l'acide geniposidique(46) et l'alpinoside(9)

Cette même étude, sur les racines, a révélé la présence de deux nouveaux bisiridoïdes glycosylés, les globulosides A (47) et B (48); avec un iridoïde glycosilé connu, la globularidine (49) et un lignan glycosylé, le liriodendrin; ainsi que sept phenylethanoïdes glycosylés, l'arenarioside, le verbascoside (14), l'isoacteoside (15), le crenatoside(40), l'isocrenatoside(25), et les trichosanthosides A et B.



L'étude chimique sur les parties aériennes de l'espèce *G. elongata* par Klimek B. en 1988 [24], a permis d'isoler et d'identifier trois flavonoïdes

aglycones : l'apigénine (50) la lutéoline (51) et la 6-hydroxylutéoline (52) et trois autres dérivés glycosylés : la 6-hydroxyluteolin 7-sophoroside et deux nouveaux flavonoïdes acylés, la 6-hydroxyluteolin 7-6'''-caffeoylsophoroside et la 6-hydroxyluteolin 7-6'''-p-coumarosophoroside



M. Ameer et ses collaborateurs [25] ont particulièrement étudié l'espèce *Globularia arabica* Jaub. et Sp. cette étude effectuée sur l'extrait éthanolique, a permis d'isoler deux iridoïdes glycosides nommés globularine (23) et globularidine (49).

Après avoir aborder la présentation de la famille des globulariacées, leur distribution dans le monde ainsi que les principaux métabolites secondaires présents dans cette famille dans les chapitres suivant nous reportons à nos travaux sur l'espèce *Globularia alypum*.

- [1] H.Gaussen., H. F., Leroy. Précis de botanique (végétaux supérieures), 1982, 2^{ème} édition, p.412
- [2] P. Quezel., S. Santa., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, 1963, tome II .CNRS, Paris. P.860.
- [3] T. Baytop, "Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present)" No. 3255, p. 419, Istanbul University Publications, Istanbul (1984).
- [4] E. Sezik, M. Tabata, E. Yesilada, G. Honda, K. Goto and Y. Ikeshiro, J. Ethnopharm., 35, 191-196 (1991).
- [5] Boulos, L., 1983. Medicinal Plants of North Africa, p.92
- [6] I. Calis, Bimolecular Aspects of Biodiversity Innovative. Nov. 3-8, 2001, 137-149.
- [7] I. Calis, I. Saracoglu, M. Zor, R. Alacam, Turk. J. Med & Pharm., 1988, 12; 230
- [8] C. Andary, Caffeic acid glycoside esters and pharmacology. In: A. Scalbert Ed. Polyphénolic phenomena. INRA Ed., Paris, 1993, pp. 237-255.
- [9] H. Sasaki, H. Nishimura, T. Morata, M. Chin, H. Mitshuhashi. Y. Komatsu, H. Maruyama, T. Guo-rui, H. Wei, X. Yu-Long, Planta Med., 1989, 55, 458.
- [10] U. B. Ismailoglu, I. Saracoglu, U. S. Harput, I. Sahin-Erdeli, J. Ethnopharmacol., 2002, 79. 193
- [11] P. Sarkhail, M. Abdollahi, A. Shafiee, Pharmacol. Res., 2003, 48, 263.
- [12] O. Sticher, Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity. In: Wagner, H.? Wolff, P. Ed. New Natural Products and plant drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity. Springer-Verlag, New York, Berlin, 1977.
- [13] J. Holzel, The genus Valerian. In: P. J. Houghton, Ed. Valerian, Harwood Academic Publishing, Amsterdam, 1997.

- [14] H. Kenzel, H. Stummerer-Schmid. *Phytochemistry*, 1970, 9(10), 2237-9.
- [15] R. K. Chadhuri, O. Sticher. *Helvetica Chimica Acta*, 1980, 63(1), 117-20.
- [16] H. Kirmizibekmez, I. Calis P. Akbay, O. Sticher. *Journal of Biosciences*, 2003, 58(5/6), 337-341.
- [17] H. Kirmizibekmez, I. Calis, S. Piacente, C. Pizza. *Turkish Journal of Chemistry*, 2004, 28(4), 455-460.
- [18] H. Kirmizibekmez, I. Calis, S. Piacente, C. Pizza. *Helvetica Chimica Acta*, 2004, 87(5), 1172-1179.
- [19] I. Calis, H. Kirmizibekmez, D. Tasdemir, O. Sticher, C. M. Ireland. *Journal of Biosciences* 2002, 57(7/8), 591-596.
- [20] H. Kirmizibekmez, P. Akbay, O. Sticher, I. Calis. *Journal of Biosciences*, 2003, 58(3/4), 181-186.
- [21] I. Calis, H. Kirmizibekmez, D. Tasdemir, C. M. Ireland. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 50(5), 678-680.
- [22] I. Calis, H. Kirmizibekmez, H. Rueegger, O. Sticher. *Journal of Natural Products*, 1999, 62(8), 1165-1168.
- [23] I. Calis, H. Kirmizibekmez, O. Sticher. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(1), 60-64.
- [24] B. Klimek. *Phytochemistry*, 1988, 27(1), 255-8.
- [25] M. Amer, S. Elmasry. *Alexandria Journal of Pharmzaceutical Sciences*, 1988, 2(2) 153-5.

Étude phytochimique de l'espèce *Globularia alypum* L.

III-1-Introduction

Comme il a été décrit dans le premier chapitre les principaux métabolites secondaires du genre *Globularia* sont, les flavonoïdes, les phényléthanoïdes et les iridoïdes. Dans ce qui suit nous nous intéressons à l'espèce, *Globularia alypum* L., dont nous allons déterminer les principaux métabolites secondaires en adoptant un protocole d'extraction basé sur des polarités croissantes.

III-2-Place dans la systématique

Embranchement	→	Angiosperme
Classe	→	Dicotyledone
Sous classe	→	Asteridae
Ordre	→	Scrophlariales
Famille	→	Globulariaceae
Genre	→	<i>Globularia</i>
Espèce	→	<i>Alypum</i>

III-3- Description botanique et aire géographique

Arbuste rameux d'environ 60 cm de hauteur. Feuilles coriaces, glauques, de forme obovale, se terminant en une petite pointe. Fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges. Calice velu à 5 dents aigues. Corolle bleue, bilabée, ayant la lèvre supérieure très courte et l'inférieure, à 3 dents ; 4 étamines, à anthères d'un bleu violacé. 1 style. Fruits akéniens figure III-1 [1].

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen jusqu'en Grèce, Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) et Asie mineure (Égypte, Arabie) en forêts, dans les terrains rocaillieux [1]. La période

de la floraison se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril). Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec alypon qui signifie calmer la douleur.

Globularia alypum appelée communément Tasselgha [1]; «Chebra », « Zerga »[2]. Au Maroc elle est appelée Ein larneb [3].



Figure III-1 : *Globularia alypum* L.

III-4-Etude chimique antérieure

Globularia alypum L. est chimiquement riche en composés phénoliques, les études réalisées sur cette plante sont résumées dans le tableau III-1.

chercheurs(année)	parties étudiées	les produits isolés de la plante	références
Sanchez (1933) Espagne	/	- acide cinnamique -acide pyrocatechuique	[4]
Bernard, P. (1974) France	feuilles	-globularine -catalpol -rutine -luteoline 7-glucoside -acide chlorogenique -acide cinnamique -acide caffeique -acide ferulique -acide p-coumarique	[5]
Chaudhuri R.K.(1979 et 1981) Suisse	plante entiere	-globularimine -globularinine -globularidine -globularicisine -globularine -catalpol -liriodendrine -syringine	[6.7]
Benhassine B.(1982) Tunisie	plante entiere	4',7-dihydroxyflavone apigenine-7-gucoside quercetol luteoline-7-glucoside 8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone rutoside cyanidine peonidine acide vanillique acide syringique acide caffeique acide sinapique acide p-coumarique acide ferulique acide b-resorcylique	[8.9]
Louis S.(1999) France	feuilles	globularine	[10]

Tableau III-1 : études antérieures sur l'espèce *Globularia alypum*.

III-5-Matériel végétal et extraction

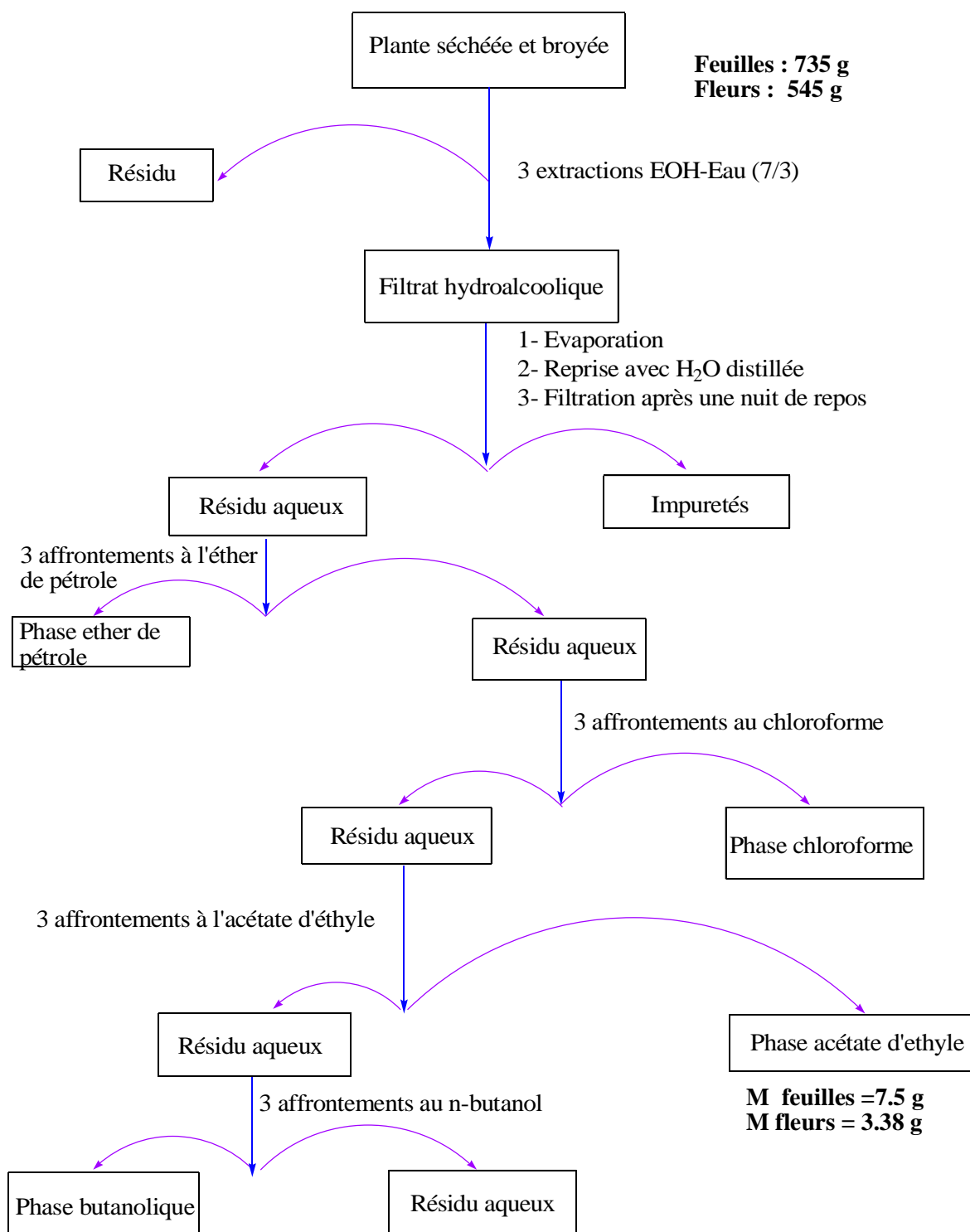
La plante a été cueillie en mars 2004 près de Tébessa, elle a été identifiée par le professeur BENAYACHE. Un échantillon a été déposé dans le laboratoire VAREN. Le poids de la matière végétale séchée est de : 735 g pour feuilles, et 545 g de fleurs.

III-6-Travaux extraction et de séparation chromatographique

Après séchage, les feuilles coupées en petits morceaux, broyées, macération dans un mélange Ethanol-Eau (70/30) trois fois pendant 24 h. Après filtration et concentration de la solution, on ajoute de l'eau distillée et on procède à des extractions successives, dans une ampoule à décanter de 2 l, à l'éther de pétrole, trichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol, avec des quantités de 3X150 ml pour chaque solvant. Les quatre extraits sont évaporés à secs puis pesés.

De la même manière on réalise l'extraction des fleurs et on obtient quatre extraits.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme de la figure III-2.

**Figure III-2** : schéma général d'extraction

Chaque extrait subit une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur le nombre de produit à séparer et donc pouvoir choisir la méthode à utiliser. Notre choix s'est porté sur la phase acétate d'éthyle.

L'extrait brut, d'acétate d'éthyle des feuilles et des fleurs 10.6 g, a été dissous dans le méthanol et mélangé avec une quantité de gel de silice puis évaporé à sec conduisant à une poudre solide qui est déposé sur une colonne de gel de silice préparée dans du chloroforme. Le mélange a été élué par le chloroforme et un gradient d'acétone jusqu'à atteindre 100% d'acétone. L'élution est ensuite poursuivie par un gradient de méthanol jusqu'à l'épuisement de l'extrait. Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-2.

Le volume (ml)	N° de la fraction	Système d'élution		
		% Chloroforme	% acétone	% méthanol
1000	1	100	0	/
1000	2	100	0	/
1200	3	99	1	/
700	4	97.5	2.5	/
1000	5	97.5	2.5	/
1200	6	97	3	/
1200	7	96	4	/
1000	8	95.5	4.5	/
800	9	95	5	/
400	10	95	5	/
800	11	93	7	/
1000	12	90	10	/
1000	13	90	10	/
300	14	85	15	/
200	15	85	15	/
200	16	85	15	/
200	17	85	15	/
200	18	85	15	/
400	19	80	20	/
400	20	80	20	/
400	21	80	20	/
600	22	75	25	/
400	23	70	30	/
400	24	70	30	/
400	25	70	30	/
300	26	65	35	/
400	27	60	40	/
400	28	60	40	/
400	29	55	45	/
1000	30	50	50	/
1000	31	40	60	/
400	32	30	70	/
800	33	30	70	/
700	34	30	70	/
800	35	20	80	/
1000	36	0	100	/
500	37	0	80	20
1000	38	0	50	50
1000	39	0	0	100

Tableau III-2: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. alypum* L.

Les fractions récoltées de la colonne ont été contrôlées sur des plaques de CCM de gel de silice 60 en utilisant divers systèmes d'élution. L'examen des plaques sous UV à 254 et 365 nm, après révélation à l'acide sulfurique, a permis de réaliser un regroupement qui est présenté dans le tableau III-3.

des fractions	Nom de la fraction	Observations
1-10	F10	Graisses et cires
11	F11	Deux taches
12-13	F12	Mélange complexe
14-15-16	F14	Mélange complexe
17-18	F17	Mélange séparable Quantité faible
19-20-21-22	F19	Quantité faible
23-24	F24	Mélange séparable
25	F25	Mélange séparable
26	F26	Mélange séparable
27-28-29	F27	Mélange complexe
30-31-32	F31	Mélange séparable
33-34-35	F34	Mélange complexe
36	F36	Produit majoritaire
37-38-39	F39	Mélange complexe

Tableau III-3 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de *Globularia alypum L.*

III-7-Séparation sur couche mince :

III-7-1-étude des fractions 25 et 24.

La purification de cette fraction a été effectuée par recristallisation. Elle est soluble dans le dichlorométhane mais insoluble dans l'hexane. Elle a été dissoute dans un minimum de dichlorométhane et saturée à l'hexane. Le mélange est chauffé à 50°C au bain marie. Laisse au repos, il se forme un précipité blanc. Après plusieurs lavage à hexane puis filtration sur verre fritté, on obtient une poudre blanche de masse 30,7 mg. C'est le composé 25a.

Notons que la fraction 24 a été purifiée par la même méthode pour donner un composé de masse 10 mg identique au composé 25a.

Le mélange des deux composés est appelé composé 25a de masse 40.7 mg.

III-7-2-étude la fraction 31

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré deux taches majoritaires. La séparation effectuée par chromatographie sur couche mince préparative a permis l'isolement des composés 31c et 35d. Les conditions de séparation sont résumées ci dessous :

Conditions chromatographiques

- Chromatographie sur Couche Mince préparative

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

Phase mobile: CHCl_3 / CH_3COCH_3 / AcOH (4:0.25:0.25)

Révéléateur: UV 254/365 nm, acide sulfurique + chauffage (100°C)

Solvants de récupération : MeOH (100%)

III-7-3-étude la fraction 26

Cette fraction montre sous lumière UV 254 nm, deux taches, une tache intense qui apparaît colorée en brun 26A et l'autre 26C. L'isolement de ces composés est effectué par CCM préparative.

Conditions opératoires

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

Phase mobile: CHCl₃ / AcOH (4: 0.25) v/v

Révélateur: UV 365 nm

Solvants de récupération : MeOH

Avec une masse de 3mg la détermination structurale complète de ce composé n'a pas pu être effectuée à cause de la quantité très faible de produit obtenu. la détermination structurale de ce composé fera l'objet de travaux futurs.

III-7-4-étude la fraction 36

La chromatographie sur couche mince de cette fraction après révélation a montré une tache majoritaire. La purification de ce composé a été effectuée par chromatographie sur couche mince préparative qui a permis d'obtenir le composé 35r.

Conditions opératoires

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

Phase mobile: AcOEt /H₂O /AcOH (8: 1 : 1) v/v

Révélateur: UV 254 nm

Solvants de récupération : MeOH

L'ensemble des travaux de séparation est reporté dans le tableau III-4.

LA FRACTION	LES COMPOSES	REMARQUE
F25 et F24	25a	PRODUIT PUR
F26	26a ; 26c	DEUX PRODUITS PURS
F31	31c ; 31d	DEUX PRODUITS PURS
F36	36r	PRODUIT PUR

Tableau III-4 : Résultat de séparation des fractions étudiées

III-8- CONCLUSION

L'isolement des constituants par les méthodes chromatographique et de recristallisation a permis d'obtenir cinq composés. Les étapes de la purification sont indiquées sur figure III-3.

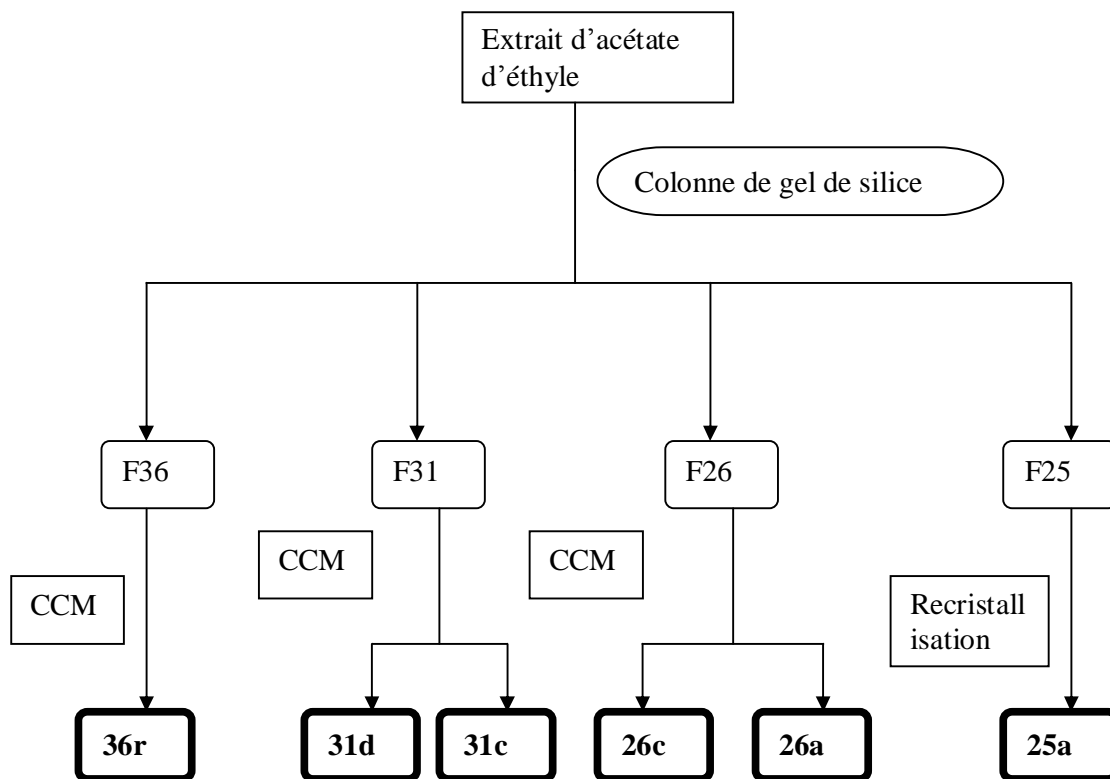


Figure III-3 : Différentes étapes du fractionnement et de la purification

- [1] N. T. Beniston and W. S. Beniston, *Fleurs d'Algérie*, 1984, E. N. L. Alger.
- [2] P. Quezel., S. Santa., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales*, 1963, tome II .CNRS, Paris. P.860.
- [3] H. Jouad, M. Maghrani, M. Eddouks. *Journal of Ethnopharmacology* 81 (2002) 351-356
- [4] J. V. Sanchez. *Anales soc. Espan. Fis quim.* 1933, 31, 361-3.
- [5] P. Bernard, M. M. Lallemand, G. Blansard. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 1974, 8(3), 174-9.
- [6] R. K. Chaudhuri, O. Sticher, T. Winkler, *Helvetica Chemica Acta*, 1979, (34), 3149-52.
- [7] R. K. Chaudhuri, O. Sticher. *Helvetica Chemica Acta*, 1981, 64(1), 3-15.
- [8] B. Ben hassine, A. Bui, Z. Mighri. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 1982, 7, 3-10.
- [9] B. Ben hassine, A. Bui, Z. Mighri, A. Cave. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 1982, 16(3), 197-205.
- [10] S. Louis, F. Darghouth-Kesraoui, B. Baghdikian, R. Elias, K. Boukef, G. Blansard. *Pharmazie*, 1999, 54(4), 309-310.
- [6] G. Caldes, B. Prescott, J. R. King. *Planta Medica*, 1975, 27(1), 72-6.

/: Le composé 26A

Interprétation :

- La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f :

Système	Toluène/Méthyl éthylcétone/Méthanol (4 :3 :3)	Eau / Méthanol / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13 :3 :3 :1)	Acide acétique 15%
R_F	0,62	0,05	0,017
Fluorescence	Violette		

montre qu'il s'agit d'un aglycone.

L'étude de la série spectrale UV (spectre n° 1) montre :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 335 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm est révélateur de la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 8$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 45$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5.

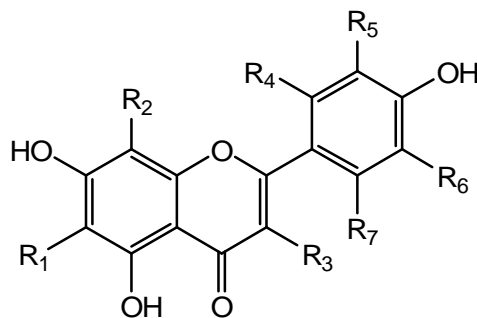
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et AlCl_3 , laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau IV-8.

Tableau IV-8 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	335	/	268	flavone
+ NaOH	392	324	274	OH libre en 4' OH libre en 7
+ AlCl_3	382	348 300	274	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+ AlCl_3/HCl	380	3344 300	274	
+ NaOAc	380	306	276	OH libre en 7
+ NaOAc/ H_3BO_3	338	/	269	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Avec R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 différents de OH.

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-12) montre:

- Un singulet à $\delta = 6,57$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,51$ ppm, le second à $\delta = 6,23$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.
- La constante de couplage $J = 8,7$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 6,97$ ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-3' et H-5', de même la constante de couplage $J = 8,7$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 7,71$ ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.

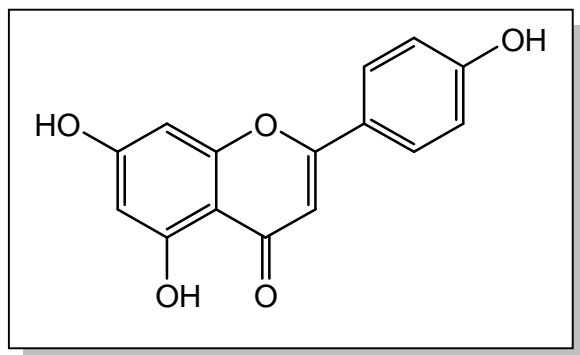
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau IV-9.

Tableau IV-9 : Données de la RMN ^1H :

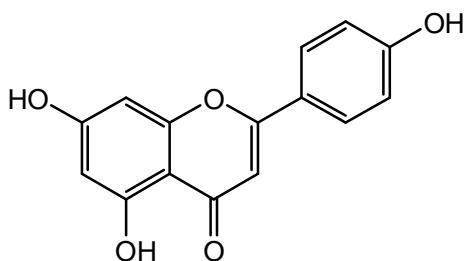
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,90	2H	d (8,7)	H-2' ; H-6'
7,02	2H	d (8,7)	H-3' ; H-5'
6,65	1H	s	H-3
6,55	1H	d (2,2)	H-8
6.26	1H	d (2,2)	H-6

Ces données complètent la structure précédente et montrent que les substituants inconnus précédemment sont des protons menant ainsi à la :

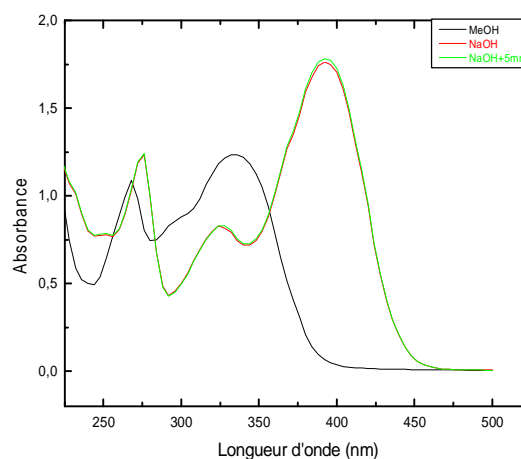
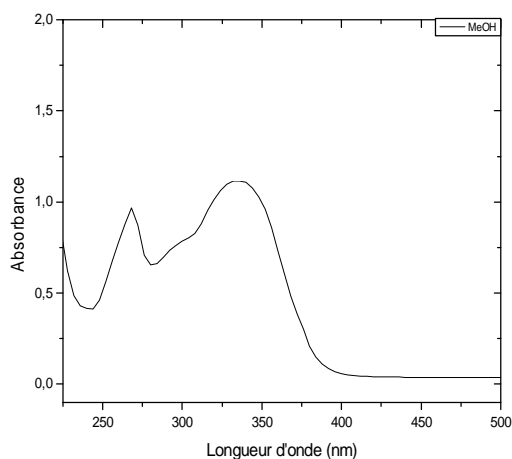
4', 5, 7-trihydroxyflavone connue sous le nom d'Apigénine.

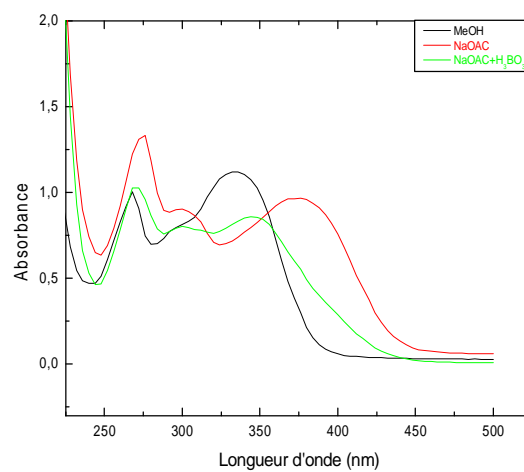
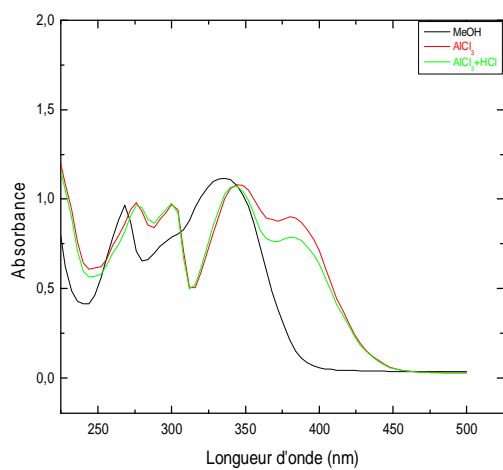


La structure de cette molécule est encore confirmée par le spectre SMIE (spectren°IV-39) qui donne un pic moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 270$ (100%) correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_5$ indiquant ainsi un squelette trihydroxyflavone. La présence du pic à $m/z = 242$ correspond à $[M-CO]^+$, de même le pic à $m/z = 153$ correspond à $[A_1+H]^+$, le pic à $m/z = 118$ correspond à $[B_1]^+$.



4', 5, 7-trihydroxyflavone
(Apigénine)





Spectre 1 : Série spectrale UV du composé 23

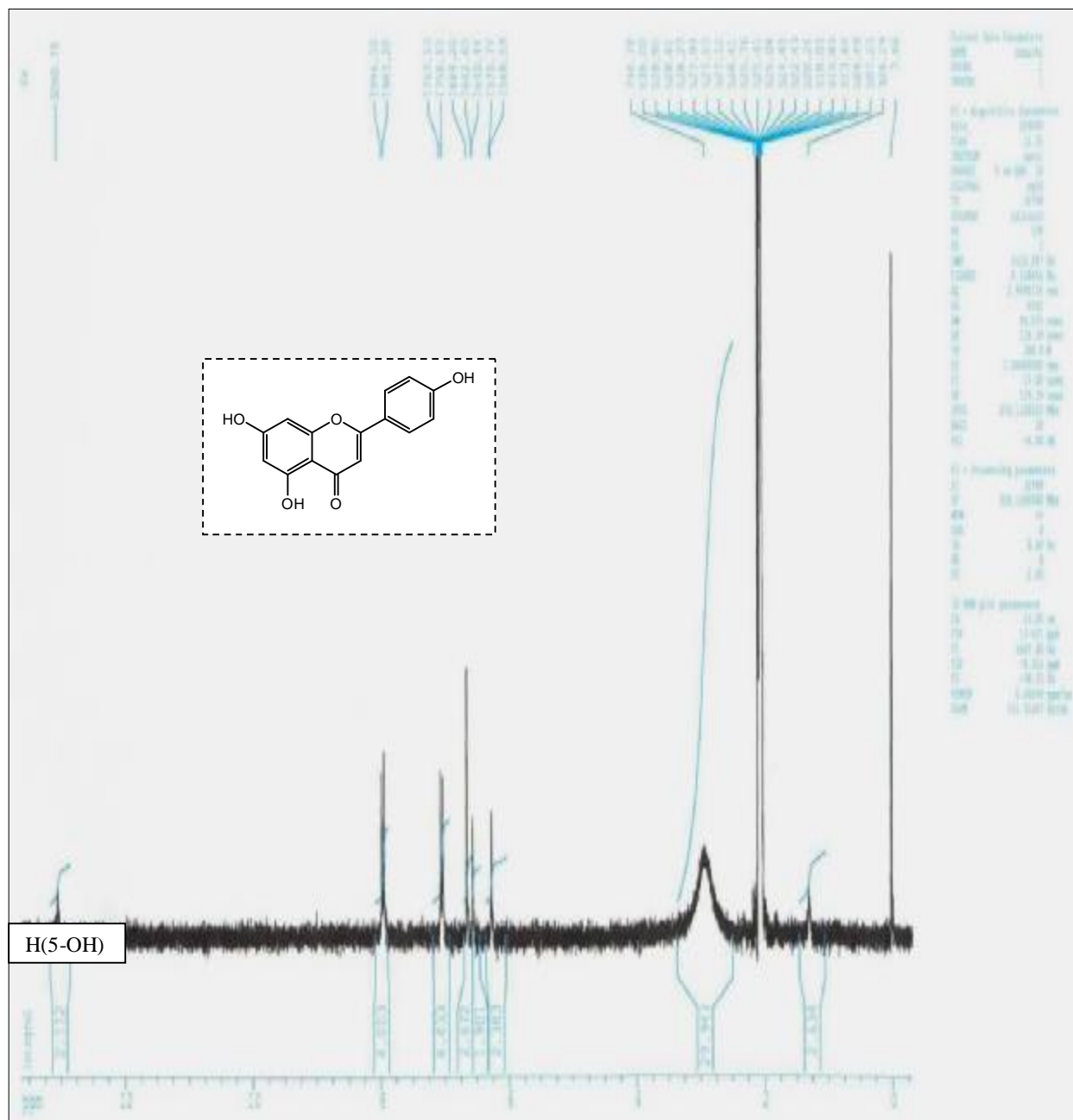
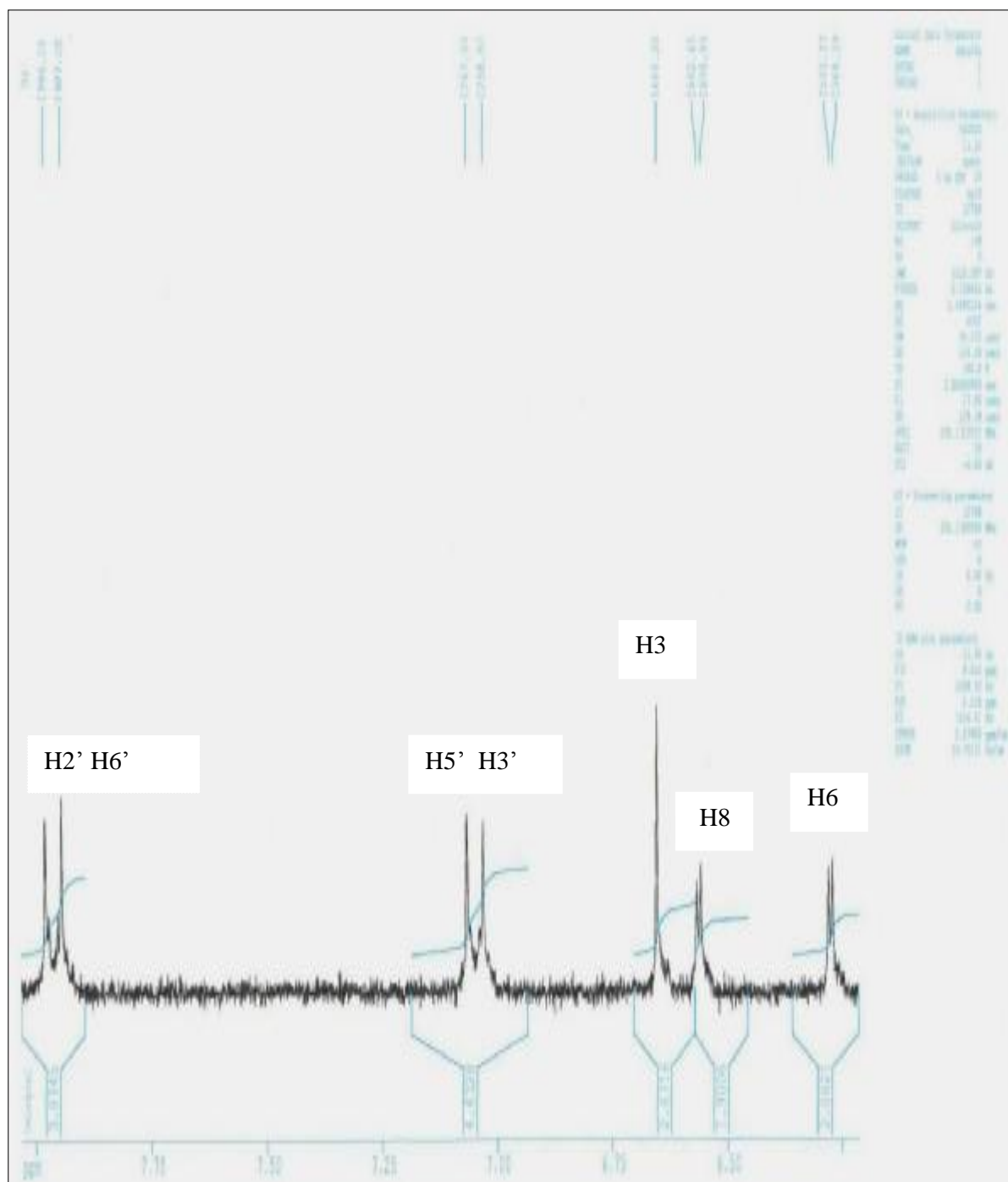


Figure : étalement de spectre RMN de 1H de 26a dans le chloroforme



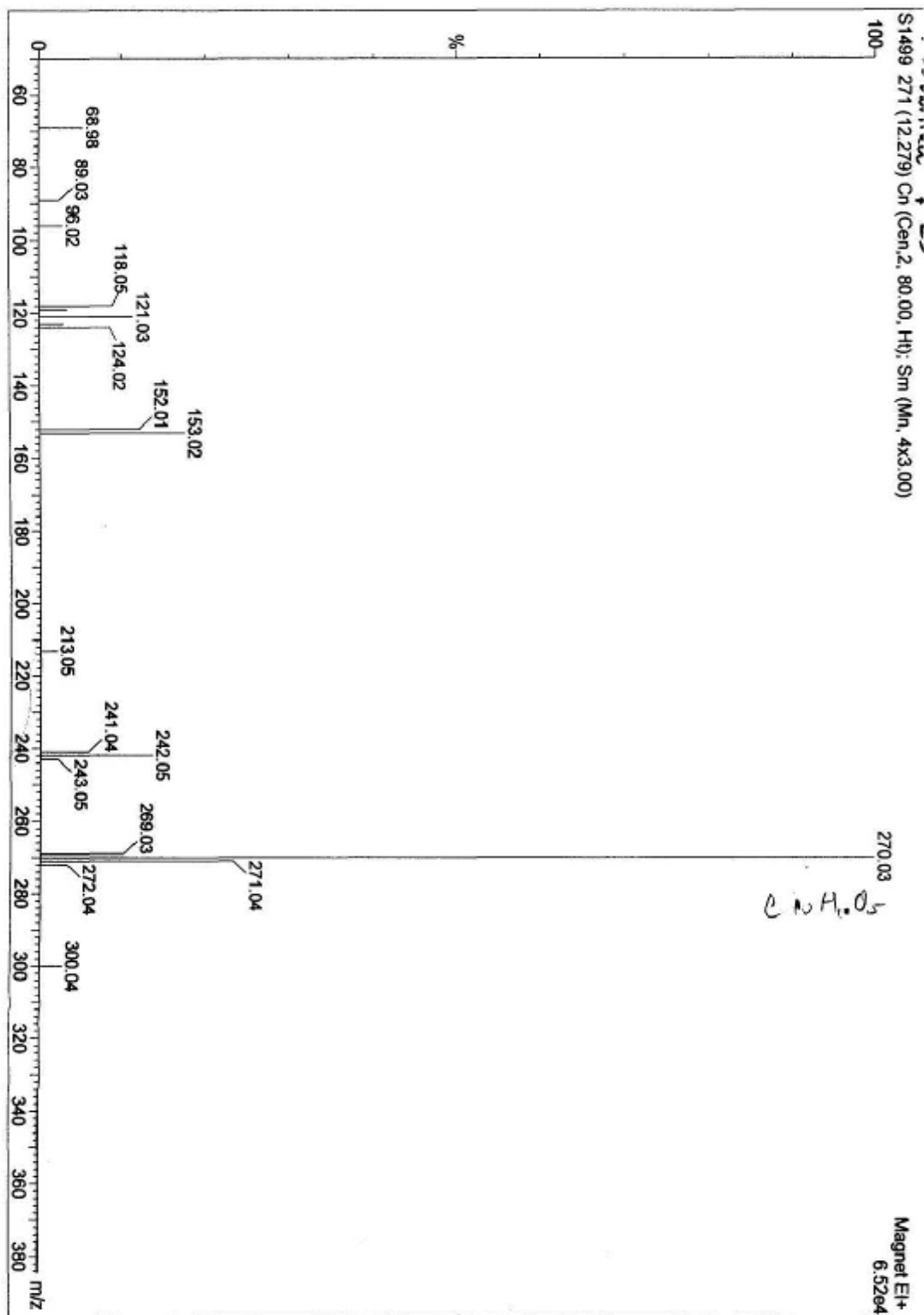


Figure : spectre de masse de 26a

II : Le composé 31c

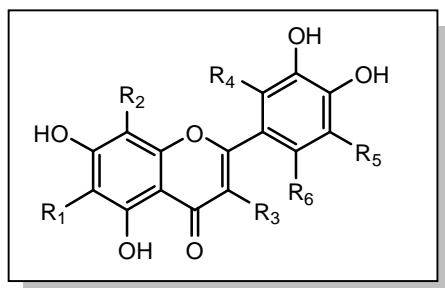
Interprétation :

La fluorescence noire violette sous 365 nm de ce composé est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Les données de la série spectrale UV (spectre n° 2, tableau IV-32) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 350 nm et la fluorescence violette signalée plus haut sont en faveur d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 52$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 329 nm indique l'existence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 5$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.
- La comparaison du spectre en présence de NaOAc et ce même spectre après addition de H_3BO_3 montre un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 49$ nm) dans ce dernier est révélateur de la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -37$ nm) du spectre enregistré dans le milieu ($AlCl_3 / HCl$) comparativement à celui enregistré dans $AlCl_3$.
- L'effet bathochrome de la bande I en comparant les spectres $AlCl_3 + HCl / MeOH$ ($\Delta\lambda = +35$ nm), indique la présence d'un OH libre en 5.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Avec R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_6 différents de OH et R_3 est un H ou un OR.

Tablrau IV-32 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	350	264	255 291	flavone
+ NaOH	402	267	329	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	422	273	303	/
+AlCl ₃ /HCl	385	274	358 297	OH libre en 5 Ortho di-OH sur le B
+NaOAc	352	269	254	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	401	269	/	Ortho di-OH sur B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN ¹H montre (spectre n° IV-48) :

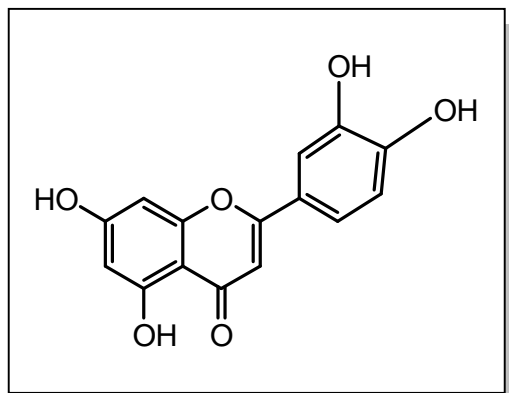
- Un singulet à $\delta = 6,57$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui permet d'opter pour une structure de type flavone.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta = 6,53$ ppm avec une constante de couplage $J = 2$ Hz attribuable à H-8, un autre signal sous forme de doublet et également d'intégration 2H à $\delta = 6,23$ ppm avec la même constante de couplage ($J = 2$ Hz) attribuable à H-6 confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du noyau A.
- Le signal à $\delta = 7,42$ ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6'. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un deux sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 8,4$ Hz et $J = 2$ Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J = 2$ Hz) caractérisant H-2'. Ce signal confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B. Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ($J = 8,4$ Hz) qui apparaît à $\delta = 6,95$ ppm, est attribuable à H-5'.

Les données relatives à la RMN ^1H sont reportées sur le tableau IV-33

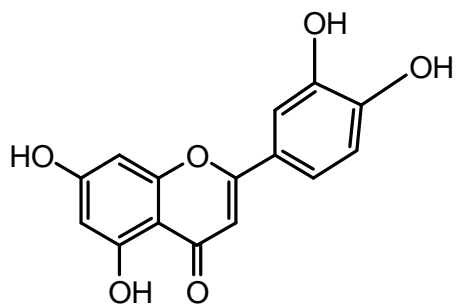
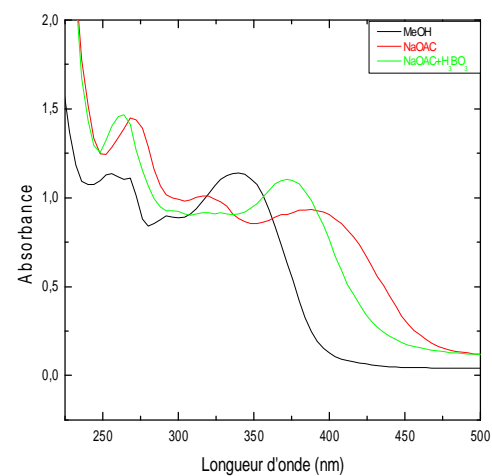
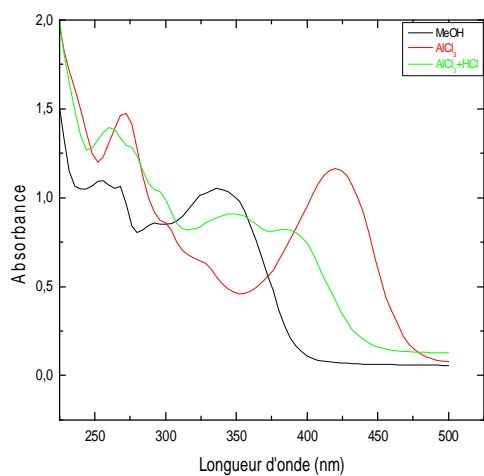
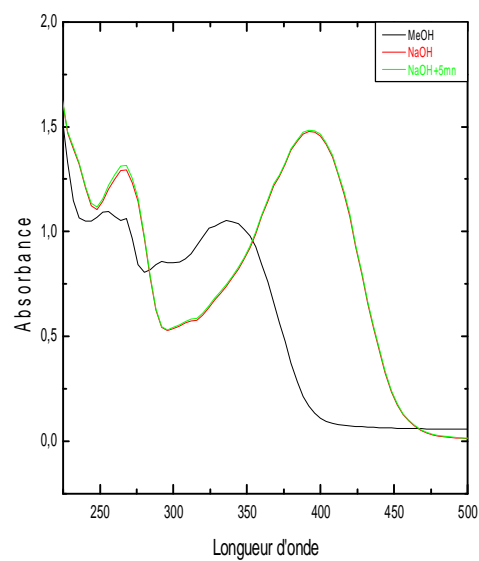
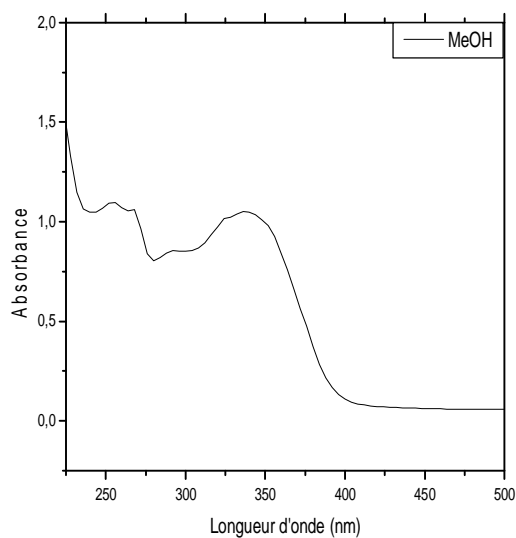
Tablrau IV-33 : Données de la SRMN ^1H :

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7,5	2H	dd (8,4 ; 2)	H-2' H-6'
7,02	1H	d (8,4)	H-5'
6,62	1H	s	H-3
6,55	1H	d (2)	H-8
6,26	1H	d (2)	H-6

Toutes ces données permettent de dire que le composé FA232 correspond à :
3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone connue sous le nom de lutéoline.



Donc le composé est effectivement : 3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone (lutéoline)

**3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone****(lutéoline)****Spectre N° IV- 47 Série spectrale UV du composé FA232**

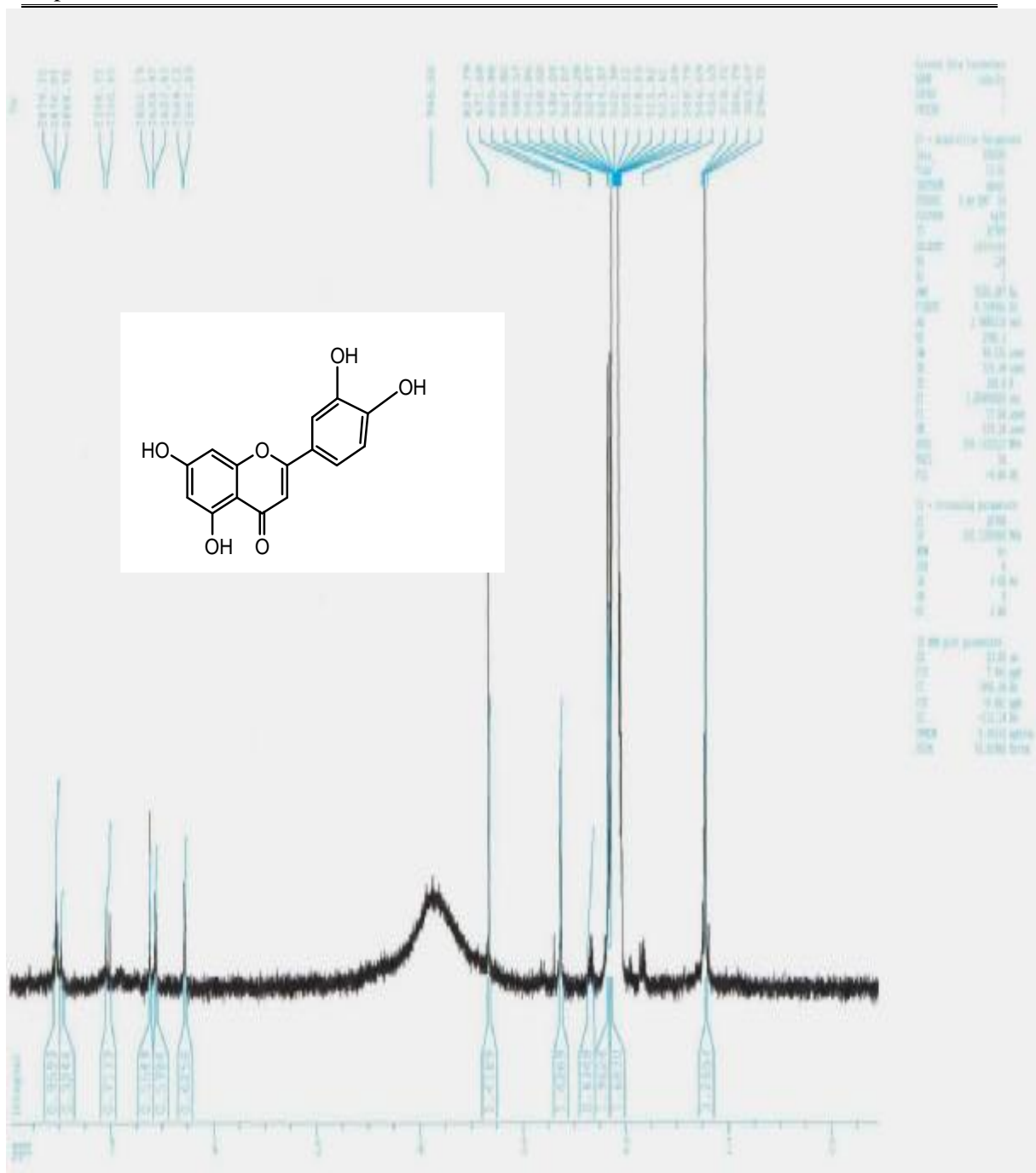


Figure : spectre RMN de 1H de 31c dans le chloroforme

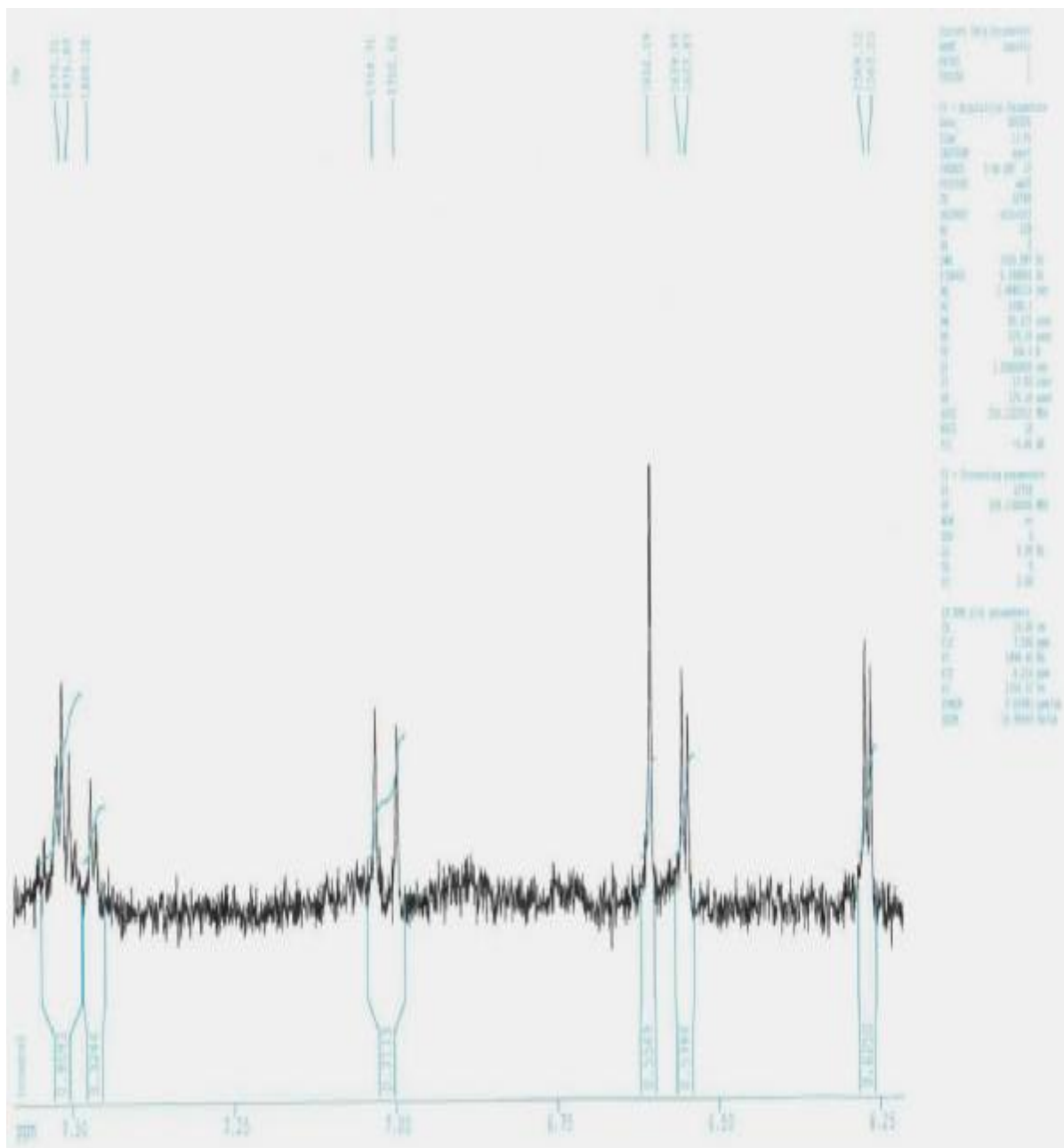


Figure : étalement de spectre RMN de ^1H de 31c dans le chloroforme

II : Le composé 25a

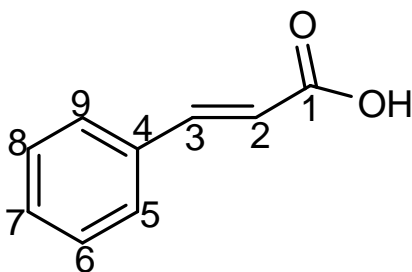
Interprétation :

Les déplacements chimiques en RMN 1H, la nature du signal, les constantes de couplage et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau

PROTON	δ H (ppm)	signal	J (Hz)
H-2	7.85	d	16.1
H-3	6.50	d	16.1
H-5. H-9	7.55	dd	8.75
H-6. H-7. H-8	7.45	m

Tableau : données RMN de 1H de 25a

Le spectre 1H révèle la présence d'un doublet à 7,85 ppm (H-2, J = 16,01 Hz), un doublet de doublet à 7,55 ppm (H-5 ; H-9, J = 8.75 Hz), un multiplet à 7.45 ppm (H-6 ; H-7. H-8,), un doublet à 6,50 ppm (H-3, J = 16.01 Hz) ; Ces données sont identiques à celles obtenues dans la littérature ()



Acide cinnamique

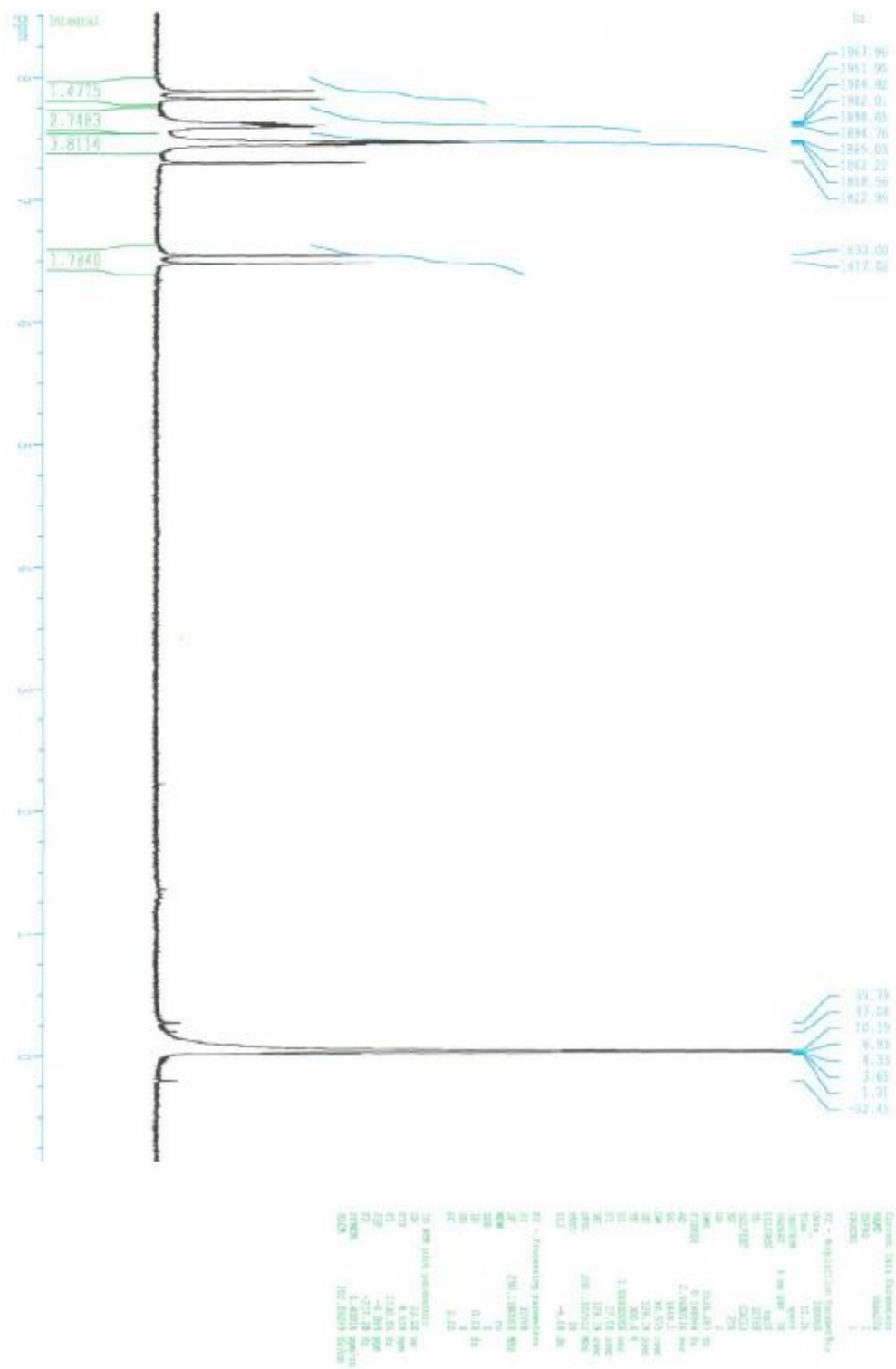


Figure : spectre RMN 1H de 25a dans le CCl₃

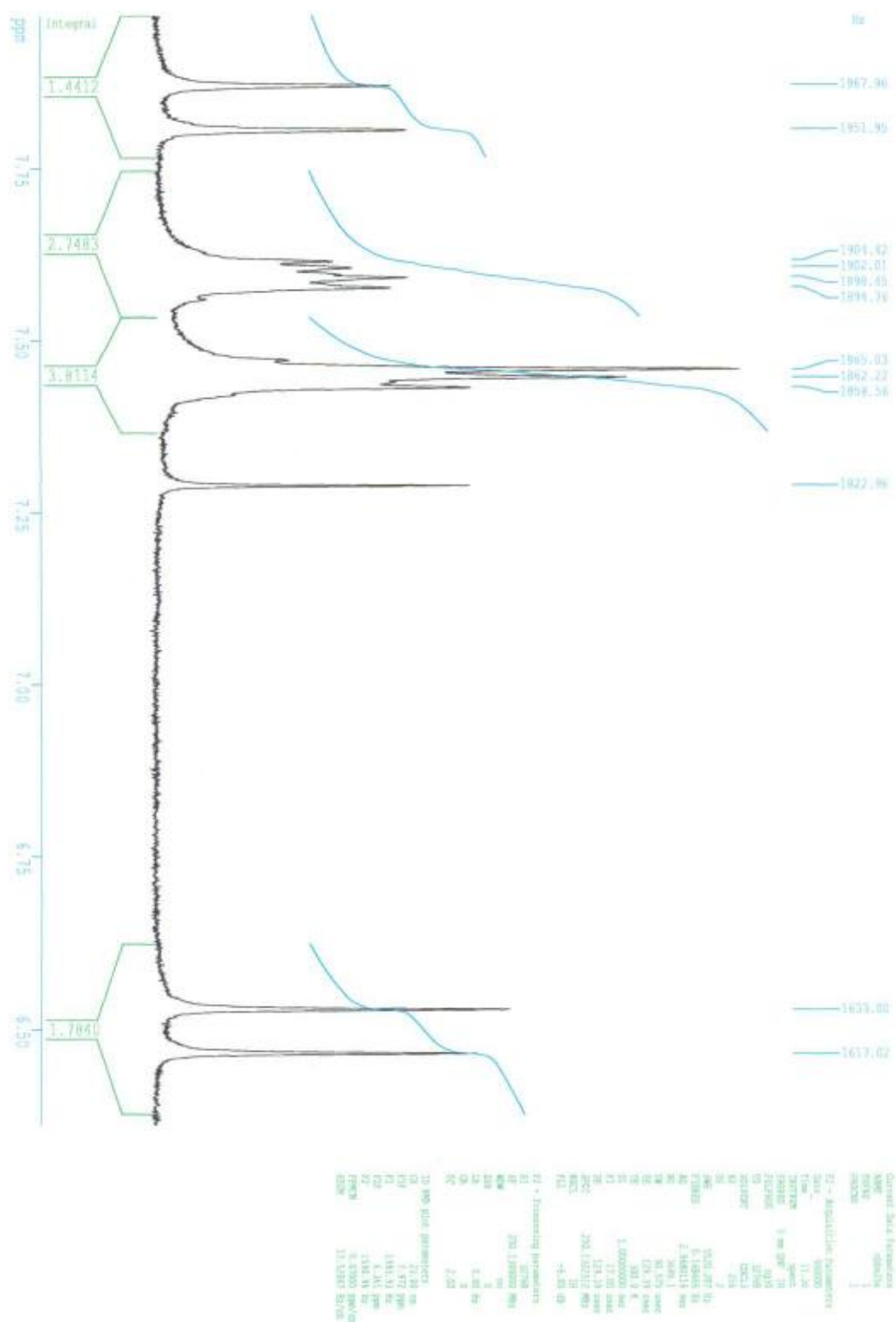


Figure : étalement de spectre RMN 1H de 25a dans le CCl₃

Conclusion

L'objet de travail a porté sur l'étude phytochimique de l'espèce médicinale, *Globularia alypum* L., utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier la purgation. L'étude bibliographique préalable réalisée sur cette espèce a montré qu'il n'existe pas beaucoup d'information de nature chimique et/ou biologique. Cependant, Au cours de nos travaux, nous avons pu isolé les métabolites secondaires majoritaires de cette plante. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques sur gel de silice 60.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectrométrie de masse (SM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles (¹H, ¹³C, Jmod) auxquelles nous avons fait appel, nous ont permis de réaliser la détermination structurale définitive et sans équivoque de la plupart des métabolites secondaires isolés.

La spectroscopie UV a été utile pour l'identification de certains métabolites secondaires présents dans nos extraits.

L'étude phytochimique des feuilles et fleurs de *Globularia alypum* L. a permis d'isoler des dérivés flavoniques, et des acides phénoliques. Ces résultats sont une contribution à l'étude phytochimique des plantes de la famille Globularicée dans la pharmacopée algérienne en général et de la plante *globularia alypum* en particulier.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Globularia alypum* L. afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans nos extraits.

- **Etudier l'activité de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmar l'activité biologique attribuée à cette plante.**
- **Réaliser l'étude biologique des molécules actives.**