

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

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° :



FILIERE : CHIMIE

OPTION : PHARMACEUTIQUE

*Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique*

Par: - Gagui Asma

- Guelil Sassia

Thème :

*Etude phytochimique de la plante *Rétama
sphaerocarpa (L) Boiss* et évaluation de son
activité antibactérienne*

Soutenu devant le jury composé de:

Hadi DEBIH

MC Université de M'sila

Président

Houcine SAADI

Pr Université de M'sila

Rapporteur

Nairouz BENZEGGOUTA

MC Université de M'sila

Examineur

Co-Encadreur : Fadila AKRIB

Année Universitaire : 2020 /2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

En préambule à ce mémoire

D'abord, louange à Dieu «ALLAH» qui, nous a offert le courage, la volonté, la patience, la bonne santé et la puissance pour compléter ce modeste travail. Surtout au cours de la crise sanitaire qui a envahi le monde, COVID-19.

Ce mémoire d'exercice a été effectué à la suite de travaux qui nous ont été possible à réaliser au sein des laboratoires de département de chimie et de département de biologie Université Mohamed Boudiaf – M'sila. Nous remercions à ce titre tous les ingénieurs responsables des laboratoires à leur bon traitement que nous avons reçu et le respect mutuel.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur le professeur **SAADI Houcine** et le Co-encadreur **Mme AKRIB Fadila** un grand merci pour ses rigueurs, ses patience et ses aides pour mener ce travail à être parfait.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury les respectables professeurs **Hadi DHABIH** et **Näïrouz BENZEGGOUTA** d'avoir accepté de participer à la discussion de notre travail.

Enfin Nous souhaitons aussi remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin pour faire réussir ce mémoire. Sans oublier, nos proches, amis et collègues.

Merci à tous

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes chers parents, de votre affection de votre sacrifice et de tous les efforts que vous avez déployés durant toute ma vie j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect. Merci pour votre présence dans les moments qui m'étaient les plus difficiles.

A mes frères et mes sœurs, veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma pleine gratitude de ma reconnaissance infinie.

A toute ma famille.

A tous ceux qui ont sacrifié leur temps pour la science et à tous ceux qui utilisent la science pour le bien et la prospérité de l'humanité.

SASSIA

Dédicace

A Ceux qui sont les plus chers au monde, mes parents :

A mon père, pour m'avoir soutenu moralement et physiquement. Cher Papa, ce travail est pour toi.

Ma mère, voici le fruit de tes efforts, de tes nombreuses nuits de prières de ta sagesse et ta générosité pour ta petite fille.

A mes frères: Nadjem Eldinne, youcef, Yacine

A mes sœurs: Nadjat, Zineb

A ma cousine Requia et ma copine Amira Amel

A tout la famille.

A mes amies et mes collègues.

ASMA

Résumé

Rétama sphaerocarpa est parmi les plantes aromatiques et médicinales les très utilisées dans le domaine de la médecine traditionnelle et le domaine pharmaceutique.

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est l'étude pratique de l'extraction des flavonoïdes et Alcaloïdes à partir de cette plante, par la comparaison entre trois méthodes de macération en utilisant des solvants de polarité différents. Afin d'évaluer l'effet du mode de l'extraction des plantes sur le rendement et sur les composés chimiques ainsi que sur leurs activités biologiques.

En effet, l'étude a prouvé que la meilleur méthode est la macération avec l'éthanol 70% : par rapport à la macération éthanolique et macération de l'eau.

L'analyse qualitative après la séparation par CCM, révélation chimique et visualisation sous UV à 254 nm et 366 nm, a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) dans tous les extraits des trois méthodes, qui confirment la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

L'extrait de di éthyle éther a révélé une activité considérable contre les deux types de bactéries (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

Les mots clés: *Rétama sphaerocarpa*, *Fabaceae*, la chromatographie, la spectroscopie, alcaloïdes, flavonoïdes, activité antibactérien.

Abstract

Retama sphaerocarpa is among the most widely aromatic and medicinal plants very used in the fields of traditional medicine and pharmaceuticals.

The objective of the work presented in this memory is the practical study of the extraction of flavonoids and alkaloids from this plant, by comparing three maceration methods using solvents of different polarity. To assess the effect of the method of extraction of plants yield and on chemical compounds as well as on their biological activities.

Indeed, the study proved that the best method is maceration with ethanol (70%) compared to ethanolic maceration and water maceration.

The qualitative analysis after separation by CCM, chemical revelation and visualization under UV at 254 nm and 366 nm, made it possible to highlight numerous spots (spots) in all extracts of the three methods. Which confirm the presence of phenolic compounds, flavonoids and alkaloids.

The extract of diethyl ether showed considerable activity against both types of bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*).

Keywords: *Retama sphaerocarpa*, *Fabaceae*, *chromatographic*, *spectroscopic*, *alkaloids*, *flavonoids*, *antibacterial activity*.

ملخص

نبته *Retama sphaerocarpa* من بين النباتات العطرية والطبية المستخدمة على نطاق واسع في مجال الطب التقليدي و الصيدلة.

الهدف من العمل المقدم في هذه المذكرة هو الدراسة التطبيقية لاستخراج مركبات الفلافونويد والقلويات من هذه النبتة من خلال مقارنة ثلاث طرق نقع باستخدام مذيبات ذات قطبية مختلفة. لتقييم تأثير طريقة استخلاص النباتات على المحصول والمركبات الكيميائية وكذلك على أنشطتها البيولوجية.

وبالفعل أثبتت الدراسة أن أفضل طريقة هي النقع بنسبة 70% من الإيثانول: مقارنة بالنقع في الإيثانول 100% والنقع المائي.

أتاح التحليل النوعي بعد الفصل بواسطة TLC، والوحي الكيميائي والتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية عند 254 نانومتر و366 نانومتر، تسليط الضوء على العديد من النقاط (البقع) في جميع مقتطفات الطرق الثلاث. مما يؤكد وجود المركبات الفينولية والفلافونويد والقلويات.

أظهر مستخلص إيثيل إيثر نشاطاً كبيراً ضد كلا النوعين من البكتيريا العصيات القولونية والمكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحية: *Retama sphaerocarpa*، البقوليات، الكروماتوغرافيا، التحليل الطيفي، قلويات، مركبات الفلافونويد، نشاط مضاد للجراثيم.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Introduction..... | 1 |
| Chapiter I :Etude bibliographique | |
| I.1.la famille des Fabaceae | 4 |
| I.2.L'espèce <i>Rétama sphaerocarpa</i> | 5 |
| I.2.1. Position systématique | 5 |
| I.2.2. Description botanique | 6 |
| I.2.3. Distribution géographique..... | 6 |
| I.2.4.Intérêt écologique de l'espèce | 6 |
| I.2.5.Intérêt pharmacologique | 6 |
| I.2.6. Intérêt économique | 7 |
| I.2.7.Composition chimique de <i>Rétama sphaerocarpa</i> | 7 |
| I.2.7.1.Les coumarines..... | 7 |
| I.2.7.2. Les tanins | 9 |
| I.2.7.3.Les saponosides | 9 |
| I.2.7.4.Les huiles essentielles..... | 10 |
| I.2.7.4.1. Quelques exemples des composés existant dans l'huile essentielle de l'espèce..... | 11 |
| I.3.Les alcaloïdes..... | 11 |
| I.3.1.Définition | 11 |
| I.3.2. Nomenclature | 11 |
| I.3.3. Le rôle biologique des alcaloïdes | 12 |
| I.3.4 .Structure et classification..... | 12 |
| I.3.4.1.Classification biogénèse..... | 12 |
| I.3.4.2.Classification structurale..... | 13 |
| I.3.5.Localisations des alcaloïdes | 14 |
| I.3.6. Propriétés physico-chimiques | 14 |
| I.3.7.Propriétés pharmaceutiques | 15 |
| I.3.8.Quelques alcaloïdes existants dans l'espèce <i>R. sphaerocarpa</i> | 15 |
| I.3.9. Biosynthèses de certains alcaloïdes existant dans l'espèce de <i>R. sphaerocarpa</i> | 16 |
| I.4. Les flavonoïdes | 17 |
| I.4.1.Définition | 17 |
| I.4.2. Structure et classification..... | 17 |

| | |
|--|----|
| I.4.2.1.Flavones | 17 |
| I.4.2.2.Flavonols | 18 |
| I.4.2.3. Flavanones..... | 18 |
| I.4.2.4. Anthocyanidines | 19 |
| I.4.2.5.Flavanols | 19 |
| I.4.3 .Répartition..... | 19 |
| I.4.4.Propriétés des Flavonoïdes..... | 20 |
| I.4.5. Les flavonoïdes existant dans l'espèce <i>retama sphaerocarpa</i> | 20 |
| I.4.6.Biosynthèses de quelque flavonoïde de la plante <i>retama sphaerocarpa</i> | 21 |
| I.5.Technique d'extraction | 22 |
| I.5.1.Infusion | 22 |
| I.5.2.Décoction | 22 |
| I .5.3.Macération..... | 22 |

Chapitre II: Méthodes d'analyses

| | |
|--|----|
| II. Techniques d'analyses..... | 24 |
| II.1.Méthodes de séparation | 24 |
| II.1.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 24 |
| II.1.2.La chromatographie sur colonne(C. C) | 27 |
| II.1.3. La Chromatographie sur papier..... | 28 |
| II.1.4.Chromatographie liquide haute performance | 29 |
| II.1.5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) | 29 |
| II.2.Méthodes d'indentification..... | 33 |
| II.2.1. La spectroscopie UV-Visible..... | 33 |
| II.2.2. La spectroscopie Infra-rouge (IR) | 34 |
| II.2.3. La spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN)..... | 35 |
| II.2.4.La spectrométrie de masse (SM) | 38 |

Chapiter III:Matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| III.1. Matériels végétaux | 42 |
| III.1.1.Matériels de laboratoire..... | 42 |
| III.1.2.Solvants et réactifs | 42 |
| III.2.Méthodes | 43 |
| III.2.1. Préparation du matériel végétal | 43 |
| III.2.2.Extraction | 43 |
| III.2.2.1.Extraction solide-liquide | 43 |
| III.2.2.2. Extraction liquide-liquide | 45 |

| | |
|---|----|
| III.2.3.Screening phytochimique | 48 |
| III.2.3.1. Test de tanins | 48 |
| III.2.3.2. test des stérols et triterpènes | 48 |
| III.3. Activité antibactérienne..... | 48 |
| III.3.1.Les bactéries | 41 |
| III.3.2. Matériels et produits utilisées | 49 |
| III.3.2.1.Matériels | 49 |
| III.3.2.2.Produits..... | 49 |
| III.3.3. Repiquage des espèces bactériennes | 49 |
| III.3.4. Préparation des milieux de culture..... | 50 |
| III.3.5. Préparation de l'inoculum..... | 50 |
| III.3.6. Préparation des disques | 51 |
| III.3.7. dilution des extraits | 51 |
| III.3.8. La lecture | 51 |
| Chapiter IV:Résultats et discussions | |
| IV.1. Étude comparative | 53 |
| IV.2. Criblage phytochimique..... | 56 |
| IV.3. Les tests chromatographiques | 57 |
| IV.3.1. L'extrait éthanol (70%)..... | 57 |
| IV.3.1.1. Polyphénols et Flavonoïdes..... | 57 |
| IV.3.1.2. Alcaloïdes..... | 58 |
| IV.3.2. L'extrait éthanolique (100%) | 59 |
| IV.4. Résultats des tests d'activité antibactérienne..... | 65 |
| IV.5. Conclusion générale | 67 |
| Référencesbibliographiques | 69 |

Liste des tableaux:

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Quelques exemples des composés existant dans l'huile essentielle de l'espèce rétama..... | 11 |
| Tableau 2: les alcaloïdes existants dans l'espèce rétama sphaerocarpa et leurs rendement..... | 15 |
| Tableau 3: Profil et teneur en alcaloïdes (alcaloïdes totaux = 100 %) de <i>Rétama raetam</i> , <i>R. sphaerocarpa</i> et <i>R.monosperma</i> | 31 |
| Tableau 4: Les différentes parties de la plante ont été examinées en détail par GLC-MS..... | 32 |
| Tableau 5: données spectrales ¹³ C- RMN des composés 12 (+rétamine)* et 14 f-cytisine)* (75 M Hz, CDCl ₃)..... | 37 |
| Tableau 6: Données spectrales ¹ H- RMN du composé 14 (- cytisine) (300 MHz. CDCl ₃)..... | 37 |
| Tableau 7: Présentation des résultats de l'extraction par trois manières de macération..... | 54 |
| Tableau 8: Les nombres et couleurs des taches de chaque extrait..... | 55 |
| Tableau 9: Le screening phytochimique de la plante..... | 56 |
| Tableau 10 : Les résultats de test chromatographique CCM des Polyphénols et Flavonoïdes dans L'extrait éthanol (70%)..... | 58 |
| Tableau 11 : Les résultats de test chromatographique CCM des alcaloïdes dans L'extrait éthanol (70%)..... | 59 |
| Tableau 12 : Les résultats des tests chromatographique CCM des flavonoïdes d'extrait éthanol (100%)..... | 64 |
| Tableau 14 : Les diamètres des zones d'inhibitions l'activité antibactériennes..... | 65 |

Liste des figures :

| | |
|--|----|
| Figure 1: Plante de <i>retama sphaerocarpa</i> | 5 |
| Figure 2 : Les feuilles et les fruits de <i>retama sphaerocarpa</i> | 6 |
| Figure 3 : Structure de base des coumarines. | 7 |
| Figure 4 : Structure des coumarines simples..... | 8 |
| Figure 5: Structure des 6, 7 furocoumarines (linéaire). | 8 |
| Figure 6: Structure des 7, 8 furocoumarines (angulaire). | 8 |
| Figure 7 : Structure des pyranocoumarines..... | 9 |
| Figure 8 : Structure des tanins (a) hydrolysables (b) condensés. | 9 |
| Figure 9 : Structure des saponpsides..... | 10 |
| Figure 10: Les structures possibles de la saponpsides aglycone. | 10 |
| Figure 11 : Quelques types d'alcoïdes et leurs précurseurs acides aminés | 13 |
| Figure 12 : Les principaux cycles azotés des alcaloïdes..... | 14 |
| Figure 13 : Biosynthèses de spartéine..... | 16 |
| Figure 14 : Biosynthèses de cytosine | 16 |
| Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes..... | 17 |
| Figure 16: Structure de base des flavones..... | 18 |
| Figure 17 : Structure de base des flavonols | 18 |
| Figure 18 : Structure de base des Flavanones. | 18 |
| Figure 19 : Structure de base des Anthocyanidines..... | 19 |
| Figure 20 : Structure de base des Flavanols..... | 19 |
| Figure 21 : Structure de 7 hydroxy- 6' méthoxy-3',4' méthylénédioxy isoflavone-glucoside..... | 20 |
| Figure 22: Structure de Daidzéine | 20 |
| Figure 23 : Structure d'Ephedroidine. | 21 |
| Figure 24 : Biosynthèses de Daidzéine..... | 21 |
| Figure 25 : Structure deCytisine..... | 37 |
| Figure 26 : Le spectre de masse (SM) de spartéine Structure de rétamine | 37 |
| Figure 27 : Le spectre de masse (SM) de spartéine..... | 39 |
| Figure 28 : Structure de rétamine..... | 39 |
| Figure 29 : La partie aérienne de <i>retama sphaerocarpa</i> après le casse..... | 43 |
| Figure 30 : Extraction éthanolique..... | 44 |
| Figure 31 : Filtration sous vide..... | 44 |
| Figure 32 : Protocol d'extraction d'espèce <i>R. sphaerocarpa</i> | 44 |

| | |
|---|----|
| Figure 33 : Elimination de solvant par évaporation rotatif. | 45 |
| Figure 34 : Protocole d'extraction des alcaloïdes..... | 46 |
| Figure 35 : Protocole d'extraction des flavonoïdes..... | 47 |
| Figure 36 : la culture des bactéries. | 50 |
| Figure 37 : Préparation des milieux de culture..... | 50 |
| Figure 38 : la disposition des disques. | 51 |
| Figure 39 : dépose les extraits sur les disques..... | 51 |
| Figure 40 : Rendement des extraits de <i>R. sphaerocarpa</i> par différent méthodes d'extractions | 55 |
| Figure 41 : Le screening phytochimique effectue sur <i>retama sphaerocarpa</i> | 57 |
| Figure 42 : Presentation des extraits de flavanoides de l'extrait ethanol 70% sous UV(LW366nm) | 58 |
| Figure 43 : Presentation des extraits d'alcaloïde de l'extrait ethanol 70% sous UV(LW366nm) | 59 |
| Figure 44 : Les extraits obtenus pour l'étude des polyphénols | 60 |
| Figure 45 : Presentation des extraits des flavonoïdes de l'extrait ethanol 100% avec le système 1 sous UV..... | 60 |
| Figure 46 : Presentation des extraits des flavonoïdes de l'extrait ethanol (100%) avec le système 2 sous UV..... | 61 |
| Figure 47 : Pes extraits obtenus pour l'étude des alcaloïdes..... | 63 |
| Figure 48 : Système 2 : Di éthyle éther/ éther de pétrole (1/1 v /v) | 63 |
| Figure 49 : Activité antibactérienne de l'extrait di éthyle éther..... | 65 |
| Figure 50 : Activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'éthyle..... | 65 |

Liste des abreviation:

CCM : Chromatographie sur couche mince

CP : Chromatographie sur papier

CC : Chromatographie sur colonne

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IR : Infrarouge

RMN: La résonance magnétique nucléaire

SM : La spectrométrie de masse

E. coli : Escherichia coli

EtOH : Éthanol

AlCl₃ : Trichloride d'aluminium

CHCl₃: Chloroforme

FeCl₃: Chlorure de fer

H₂O: Eau

HCl: Acide Chlorhydrique

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

mg : milligramme

ml : millilitre

min : minutes

mm : millimètre

R_f : Rapport frontal

T°: Température

UV : Ultraviolet

V/V : Volume/ Volume

Introduction

L'histoire des plantes médicinales est aussi longue que l'histoire des humains, depuis des milliers d'années, l'homme a été utilisé les plante pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine, voire animale.

La plupart des plantes sont constituent une source majeur de médicaments à travers leur richesse en métabolites secondaires, beaucoup de chercheurs cherchent à trouver des composants naturels tels que les saponosides, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins, les huiles essentielles et les composes phénoliques

Selon les estimations de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale utilisent encore la médecine traditionnelle afin de répondre aux besoins des soins et de la santé, en raison du coût élevé des médicaments chimiques et leur toxicité. En plus, au début du 21e siècle, 11% des 252 médicaments considérés comme de base et essentiel par l'OMS étaient exclusivement de la floraison origine végétale. Des médicaments comme la codéine, la quinine et la morphine contiennent tous des ingrédients d'origine végétale ^[1].

Beaucoup de remèdes phytothérapeutiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs. Ces observations et applications ont été enregistrées depuis des millénaires dans les diverses parties du monde ^[2].

Les rétames sont des légumineuses arbustives, possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques, caractérisés par une distribution géographique très diversifiée en partant des pourtours de la côte méditerranéenne jusqu'aux régions semi-arides et arides, ils représentent un moyen naturel de lutte contre la désertification ^[3].

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques, telle que l'activité antibactérienne et antioxydant est considère comme très importante et très utile, en particulier pour les plantes, qui sont largement utilisées en médecine traditionnelle.

Ces travaux de mémoire consistent dans un premier temps de renseigner sur la famille Fabaceae et la description botanique de l'espèce *Rétama sphaerocarpa* leur intérêt écologique, pharmacologique, économique et leur composition chimique.

Dans un second temps, nous avons utilisé d'une part des techniques d'extractions et de séparation des flavonoïdes et d'alcaloïdes à partir de la espèce et d'autre part l'étude de l'activité anti bactérienne des extrait poly phénoliques et alcaloïdiques.

Ce travail s'articuler de la manière suivante :

- Dans le premier chapitre, nous avons présenté une synthèse bibliographique.
- Dans un second chapitre, nous décrivons les techniques d'analyse.
- Le troisième chapitre est consacré à la partie expérimentale.
- Le dernier chapitre présente résultat et discussion.

Partie Théorique

Chapitre I

Etude Bibliographique

I.1. La famille des Fabaceae

La famille Fabaceae ou Légumineusae est une famille économiquement importante de plante à fleur et la troisième des plus grandes familles de plantes en nombre d'espèces, derrière la famille Orchidaceae et la famille Asteraceae, avec 751 genres et plus de 19 500 espèces. Elle regroupe de très nombreuses plantes qui poussent dans le monde entier^[4].

Les Fabaceae sont représentées par des plantes à port très variable, herbacées annuelles ou vivaces, lianes ou volubiles, arbustes et même arbres, cette famille cosmopolite s'étend des zones froides aux zones tropicales^[5].

- Les feuilles généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composées palmées, trifoliolées, ou unifoliées ; entières à parfois dentées –serrées, à nervation pennée folioles parfois transformées en vrilles ; renflement moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développés, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil; stipules présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épine^[6].
- De nombreuses fabacées hébergées bactéries symbiotiques (*Rhizobium*), ont la capacité de fixer l'azote de l'air dans leurs racines (nodules racinaires) ; parfois canaux ou lacunes sécrétrices^[6].
- Les Fleurs généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à Hypanthium court, généralement en forme de coupe, elles sont généralement 5 sépales libres ou plus souvent soudés et 5 pétales libres ou plus souvent soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différant par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés, étamine 1 à nombreuses, il y a normalement 10 étamines et un ovaire allongé supérieur, avec un style courbé. Les Fabacées sont généralement des plantes entomophiles (c'est-à-dire qu'elles sont pollinisées par insecte), et les fleurs sont généralement voyantes pour attirer la pollinisation^[6].
- Fruit généralement une gousse ou légume, être souvent déhiscent, et peut aussi être une gousse indéhiscentes, un fruit lomentacé, une samare, et parfois follicules, légumineuses, akènes, drupe et baies. L'ovaire se développe principalement dans une légumineuse^[6].

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie^[7].

Les fabacées sont distribuées dans tout le globe terrestre, mais ils sont bien mieux notés en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de diversité sont localisés également en Afrique et en Asie ^[8]. En Algérie, les fabacées ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification. Les rétames (*Rétama reatam*, *Rétama monosperma* et *Rétama sphaerocarpa*) sont un bel exemple de plantes occupant une place considérable dans les régions arides et semi-aride ^[9].

I.2.L'espèce *Rétama sphaerocarpa*

I.2.1. Position systématique

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Fabales

Famille : Fabacées

Genre : *Rétama*

Espèce : *Rétama sphérocarpa* (L.) Boisse ^[10].

Nom vernaculaire : Figel



Figure 1: Plante de *rétama sphaerocarpa*.

I.2.2. Description botanique

Rétama sphaerocarpa (L.) Boisse est une légumineuse arbustive vivace, de 1 à 2 m de haut, à rameaux pubescents plus au moins dressés. Avec une fleur de couleur jaune très petite de 5 à 6 mm, début de floraison en mi-juin, et une gousse globuleuse (7 à 8 mm de long) de couleur jaune brun^{[11][12][13]}.



Figure 2 : Les feuilles et les fruits de *rétama sphaerocarpa*.

I .2.3. Distribution géographique

Le *rétama sphaerocarpa* se trouve en beaucoup en Espagne, au Portugal et en Afrique du nord et très rare au Sahara. En Algérie, il se trouve le *rétama sphaerocarpa* en kabayile, Ghardaïa, les plaines de Batna, Ain sefra, Bouira, et Maadid de M'silla^{[14][10]}.

I.2.4.Intérêt écologique de l'espèce

Rétama sphaerocarpa est une espèce endémique du bassin méditerranéen et dans les divers climats (humides et arides) et les milieux ouverts, secs et ensoleillés des écosystèmes méditerranéens, ces espèces de plantes sont de stabilisation d'une dune d'écologie, de fixation des sols et de revégitalisation des écosystèmes semi-arides et arides^[15].

Elle à la capacité de fixer l'azote en raison de sa symbiose au niveau de ses racines avec les rhizobiums, avec un système racinaire profond lui permet d'atteindre des sources d'eau profonde^[16].

I.2.5.Intérêt pharmacologique

Rétama sphaerocarpa sont des arbustes des déserts sauvages poussant en Algérie, et ils sont couramment utilisés comme plante de guérison avec des effets antiseptiques, antipyrétiques et anti diarrhéiques. La décoction de parties aériennes de *rétama sphaerocarpa*, sont utilisés en

médecine traditionnelle pour le traitement du diabète, l'hypertension et les rhumatismes, ainsi que anti-inflammatoires. Ce pharmacologique dû à la présence de certains alcaloïdes et des flavonoïdes.

En plus *rérama sphaerocarpa* présente une activité antioxydant, antimicrobienne et antifongique^[17].

I.2.6. Intérêt économique

Les rétames sont considérés comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage. Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm^[18].

Dans leur graines se trouvent des substances telles que des lectines et des protéines qui sont provoquent des réactions allergiques, cette caractéristiques donne à la plante une défense contre les insectes. Ainsi, les biopesticides peuvent être fabriqués^[19].

I.2.7. Composition chimique de *Rétama sphaerocarpa*

I.2.7.1. Les coumarines

Les coumarines sont des métabolites secondaires polyphénoliques dont la structure comporte le noyau benzo-apyrone (coumarine) résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique.

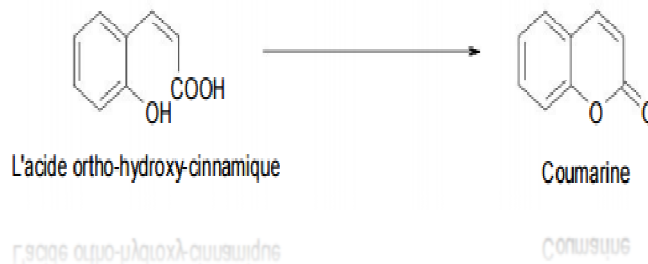


Figure 3 : Structure de base des coumarines.

On distingue deux types de coumarine:

- Coumarines simples :

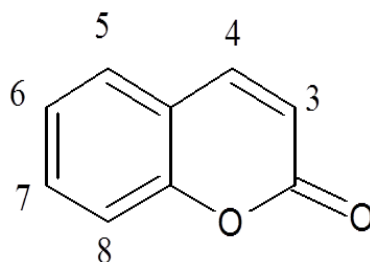


Figure 4 : Structure des coumarines simples.

- Coumarines complexes où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo a pyrone.

On distingue :

- - Les furocoumarines (ou furanocoumarines) :
- ✓ 6, 7 furocoumarines (linéaire).

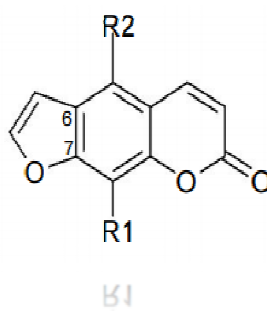


Figure 5: Structure des 6, 7 furocoumarines (linéaire).

- ✓ 7, 8 furocoumarines (angulaire).

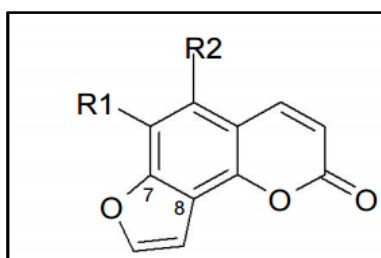


Figure 6: Structure des 7, 8 furocoumarines (angulaire).

- Les pyranocoumarines :

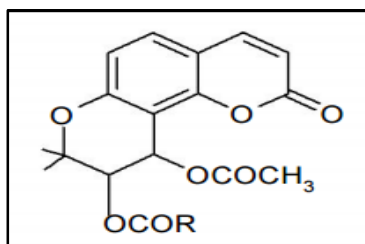


Figure 7 : Structure des pyranocoumarines

Ils ont des propriétés pharmacologiques très importantes comme antivirales, tranquillisantes, et anticoagulantes ^[20].

Les coumarines sont des molécules à grande échelle dans les règnes végétaux. Elles sont surtout présentes chez les Dicotylédones et abondantes dans certaines familles : Rutaceae, Fabaceae, Apiaceae, Oléaceae, Loganiaceae, Solanaceae, Asteraceae et Hippocastanaceae ^[21].

I.2.7.2. Les tanins

Les tanins sont des substances de la famille polyphénolique, possédant un poids moléculaire entre 500 et 3000 Da ^[22]. Ils sont localisés dans l'écorce, les feuilles et les fruits de nombreuses plantes, sont divisés en deux types, tanins hydrolysables et tanins condensés ^[23].

Les tanins ont plusieurs propriétés thérapeutiques, ils sont utilisés comme tannage de la peau animale, réparation des dommages des tissus dus à l'eczéma et anti-constipation ^[24].

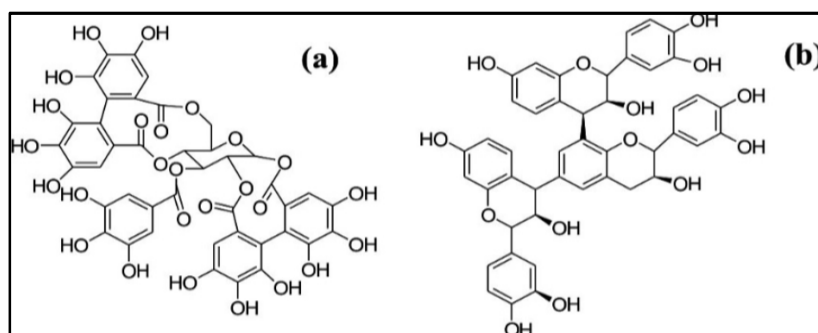


Figure 8 : Structure des tanins (a) hydrolysables (b) condensés ^[25].

I.2.7.3. Les saponosides

Le terme saponosides est dérivé du mot savon, sont des hétérosides, se trouvent sous forme triterpène et stéroïde ^[26]. Ils ont une propriété tensioactive ^[27].

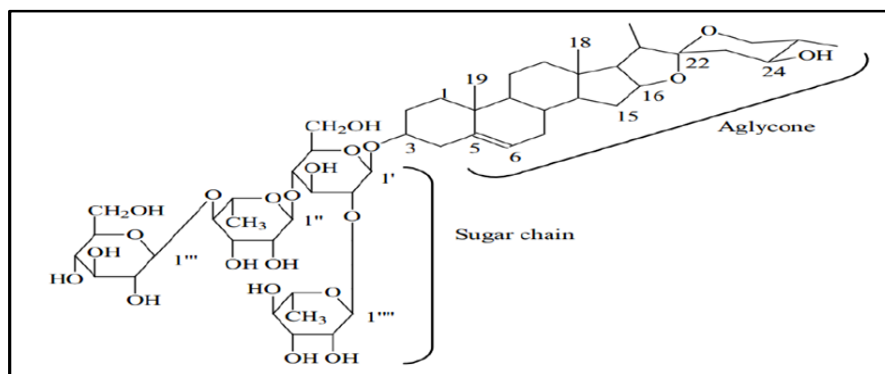


Figure 9 : Structure des saponides ^[28].

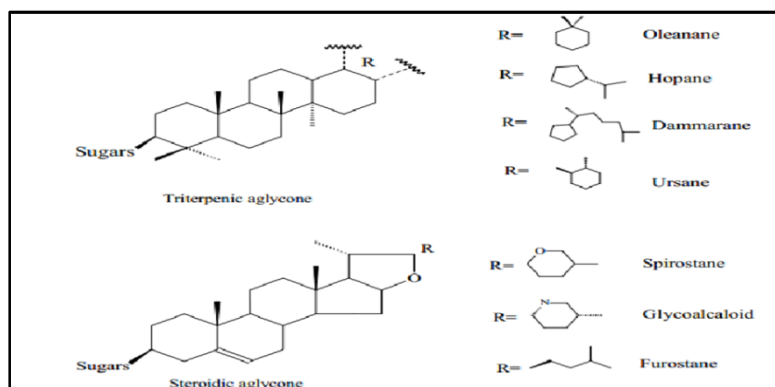


Figure 10: Les structures possibles de la saponides aglycone ^[28].

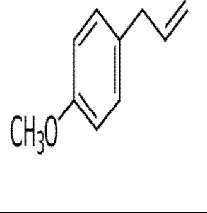
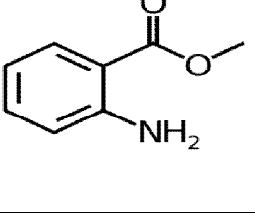
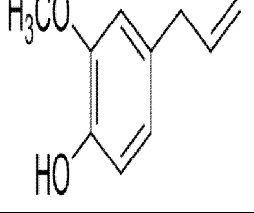
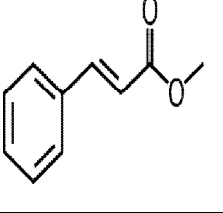
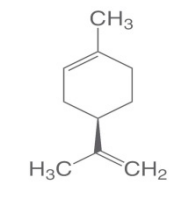
I.2.7.4. Les huiles essentielles

Ce sont des produits huileux, volatiles et odorants, sont localisés le plus souvent dans des organes sécréteur. Les hulies essentielles utilisés comme anti-inflammatoires, il est également expulse les gaz inestinaux ^[24].

La composition chimique d'une H.E est assez complexe, ou y trouve généralement de nombreux constituants, ceux-ci appartiennent principalement à deux grands types chimiques : Les composés terpéniques comme (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, Triterpène). Et les composés aromatiques dérivés phénylpropane, ce sont très souvent des alkyls et prophenylphenols, par fois des aldéhydes ^[24].

I.2.7.4.1. Quelques exemples des composés existant dans l'huile essentielle de l'espèce rétama

Tableau 1 : Quelques exemples des composés existant dans l'huile essentielle de l'espèce rétama ^[29] ^[30].

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |
| Estragole | Methylantranilate | Eugenol | Methylcinnamate | D-(+)-Limonene |

I.3. Les alcaloïdes

I.3.1. Définition

Les alcaloïdes sont des composés cycliques qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote dans leur structure chimique. Ils sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante et la partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils sont synthétisés ^[31], nous pouvons les trouver dans de nombreuses familles de plantes, et la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool ^[32] ^[33].

Ils sont amers et apéritifs, ils sont à la base de nombreuses molécules thérapeutiques ^[34].

I.3.2. Nomenclature

Les alcaloïdes n'ont pas de nom officiel, ils dérivent de la plante qui a été extraite ou de la personne qui a découvert la plante. Ils se terminent souvent par « -ine » s'il est amine, comme on peut aussi être ajouté un suffixe « -idine », « -anine », « -aline », ou « -inine » ^[35].

Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène, de l'azote, en plus de l'oxygène ^[36].

I.3.3. Le rôle biologique des alcaloïdes

Le rôle des alcaloïdes sont très important dans les métabolismes de la plantes mais souvent inconnu, et n'est pas définie. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent :

- Un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes.
- Produits d'excrétion du métabolisme azoté parfois.
- Substances de réserve.
- Protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV ^[31].

I.3.4 .Structure et classification

La classification des alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structural.

On estime qu'il a plus de 8000 composés naturels ont été identifiées comme alcaloïdes, donc la classification des alcaloïdes est comme suit : leur structures chimiques, leur activités biologiques et écologiques, et leur voies biosynthèse, et biogénétique

I.3.4.1. Classification biogénèse

- ✓ **Alcaloïdes vrais** : ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétique formés à partir d'un acide aminé.
- ✓ **Pseudo-alcaloïdes** : ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des acides aminés.
- ✓ **Proto- alcaloïdes** : ce sont des amines simple dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés ^[21]
[37].

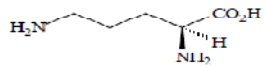
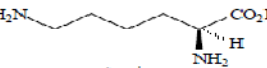
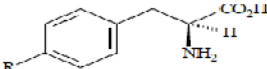
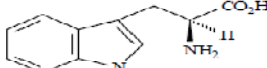
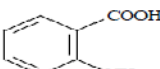
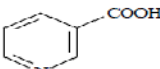
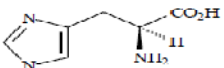
| Acide aminé | Type d'alcaloïde |
|--|--|
|  <p>Ornithine</p> | Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes |
|  <p>Lysine</p> | Pipéridines, quinolizidines, indolizidines |
|  <p>R = H, Phénylalanine R = OH, Tyrosine</p> | Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines |
|  <p>Tryptophane</p> | Indoles |
|  <p>Acide anthranilique</p> | Quinoléines, quinazolines, acridines |
|  <p>Acide nicotinique</p> | Pyridines |
|  <p>Histidine</p> | Imidazoles |

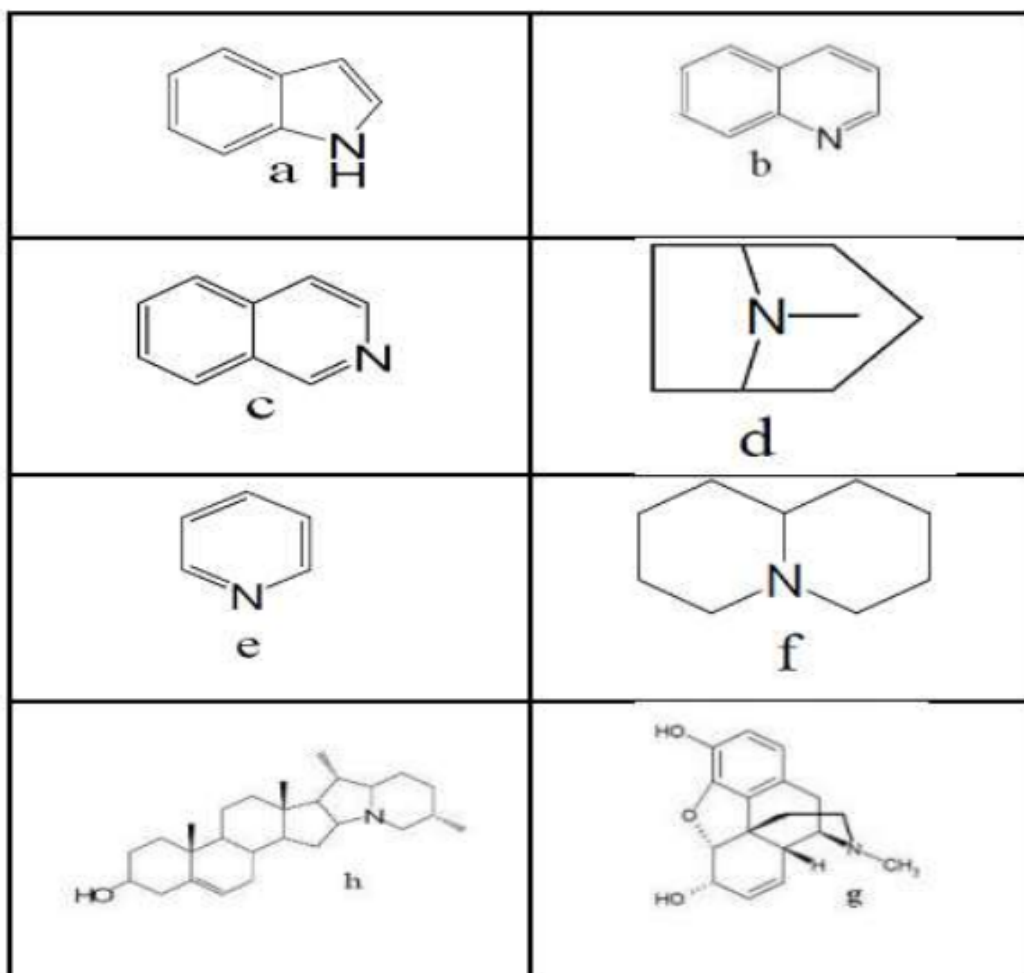
Figure 11 : Quelques types d'alcaloïdes et leurs précurseurs acides aminés [38].

I .3.4.2. Classification structurale

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

- ❖ **Groupe des phényléthylamines** : éphédrine, mescaline, méthamphétamine.
- ❖ **Groupe des quinoléiques**: acridine, acide bicinchoninique, broxyquinoline, chlorquinaldol, clioquinol.
- ❖ **Groupe des tropane** : scopolamine, atropine, cocaïne, hyoscyamine.
- ❖ **Groupe des isoquinoléines** : diméthisoquine, quinapril, débrisoquine.
- ❖ **Groupe des indoles** : tryptamine (psilocybine, sérotonine), (ergolavine, ergocornine), β-carbonile (harmine, réserpine).
- ❖ **Groupe des pyrrolidines** : aniracétam, anisomycine, histapyrodine, diphénylprolinol, oxacéprol.
- ❖ **Groupe des azines** : pipéridines, conicine, trigonelline, arécaidine, nicotine, spartéine.
- ❖ **Groupe des purines** : xanthine : caféine, thiopromine, théophylline [39].

Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont de type (Figure 3) : Indole (a), quinoline (b), isoquinoline (c), tropane (d), pyridine (e), quinolizidine (f), morphine (g) et solanidine (h) (stéroïde).



Figures 12 : Les principaux cycles azotés des alcaloïdes^[40].

I.3.5. Localisations des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont inégalement répartis parmi les plantes, ils s'accumulent dans les écorces, dans les feuilles ou dans les fruits, ils sont produits dans diverse organes des plantes^[41].

I.3.6. Propriétés physico-chimiques

- ✚ Bases non oxygénées, sou forme liquides à température ambiante Ex : nicotine, spartéine, coniine.
- ✚ Masse moléculaire entre 100 et 900 g/mol.
- ✚ Bases oxygénées : sous forme solides cristallisables, rarement colorés.
- ✚ Pouvoir rotatoire : capable de dévier la lumière polarisée.
- ✚ Insolubles ou très peu solubles dans l'eau, si une base.

✚ Solubles dans l'eau, en cas de sel^[42].

I.3.7. Propriétés pharmaceutiques

Les alcaloïdes ont des propriétés généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques. Il est utilisé comme :

- Dépresseurs au niveau du système nerveux central (morphine, scopolamine).
- Stimulants (caféine, strychnine).
- Anesthésiques locaux (cocaine).
- Ganglioplégiques (spartéine, nicotine).
- Parasympathomimétique (physostigmine ou éserine, pilocarpine^[43]).

I.3.8. Quelques alcaloïdes existants dans l'espèce *R. sphaerocarpa*

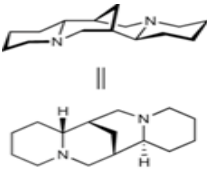
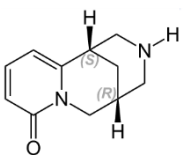
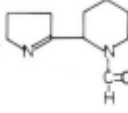
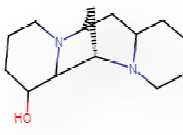
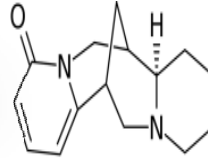
-Alcaloïde à squelette quinolizidinique

-**Anagrine** : un composé aromatique tétracyclique classé dans les alcaloïdes quinolizidiniques.

-**Ammodendrine** : Un alcaloïde pipéridine qui est la pipéridine substituée par un groupe 1-acétyl-1, 4, 5,6-tétrahydropyridin-3-yle en position 2 (le stéréo-isomère 2R).

Cytisine : est un alcaloïde de la famille des pyridines.

Tableau 2 : les alcaloïdes existants dans l'espèce *retama sphaerocarpa* et leurs rendements^[44]
[45].

| Alcaloïdes | Spartéine | Cytisine | Ammodendrine | Retamine | Anagrine |
|----------------|---|---|--|---|---|
| Rendement % | 1,23 | 1.81 | 7.22 | 44 | 3.30 |
| Les structures |  |  |  |  |  |

I.3.9. Biosynthèses de certain alcaloïde existant dans l'espèce de *R. sphaerocarpa*.

Dans la plante la biosynthèse des alcaloïdes est variable, elle dépend de l'espèce considérée, des conditions environnementales auxquelles l'espèce est soumise, de la période et de conditions de récolte de la plante.

- Biosynthèses de spartéine [134].

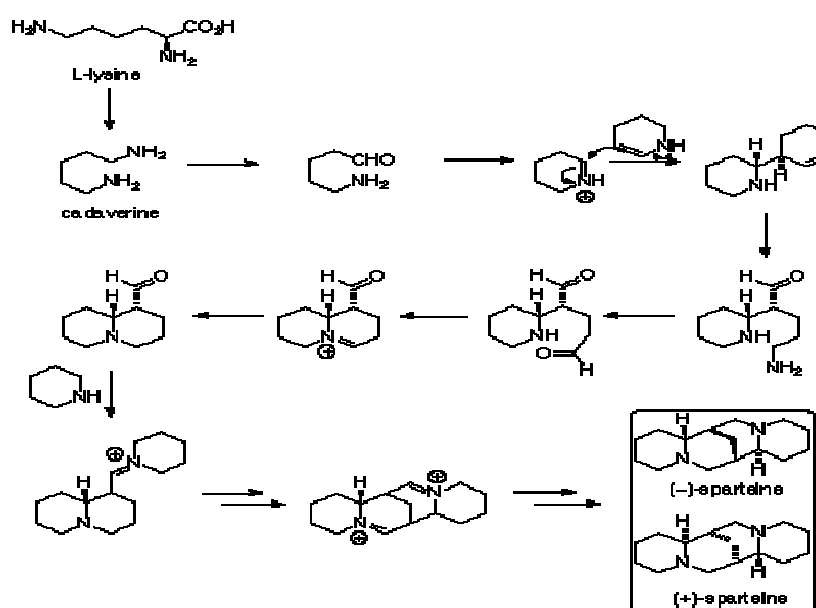


Figure 13 : Biosynthèses de spartéine.

- Biosynthèses de cytisine [135].

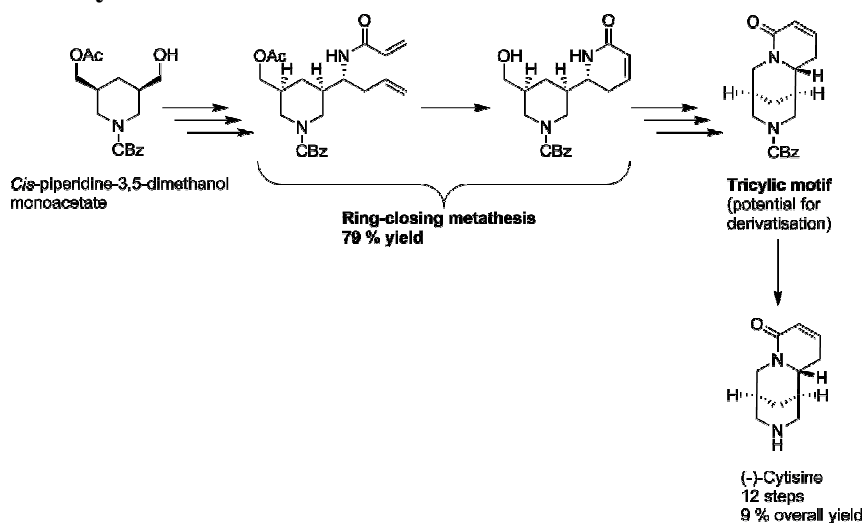


Figure 14 : Biosynthèses de cytisine.

I.4. Les flavonoïdes

I.4.1. Définition

Sont des composés naturels polyphénoliques. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, il est généralement sous forme libre ou sous forme d'un glycoside. Ils sont localisés dans divers organes des plantes telle que, racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits^[46].

I.4.2. Structure et classification

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone^[47].

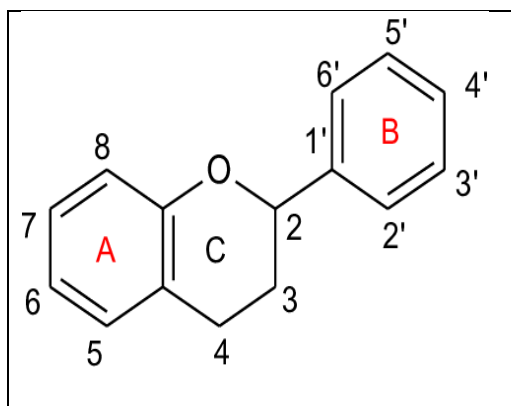


Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes^[48].

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes de molécule, Les principales classes de flavonoïdes sont :

I.4.2.1. Flavones

Le noyau flavone dérivé du noyau flavane de base (dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) par la fixation à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison.

Les principaux flavones sont l'apigénine et la lutéoline. Elles ont dans la majorité des cas la forme de glycosides^[49]

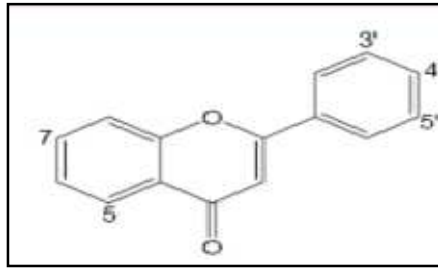


Figure 16: Structure de base des flavones^[50].

I.4.2.2. Flavonols

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3. En plus de ce radical OH, les diverses molécules de flavonols en comprennent deux, trois, quatre ou cinq autres. Les flavonols sont beaucoup plus abondants dans le règne végétal que

Les flavones et leurs concentrations sont plus élevées. Les principaux sont la quercétine, kaempférol et myricétine^[48].

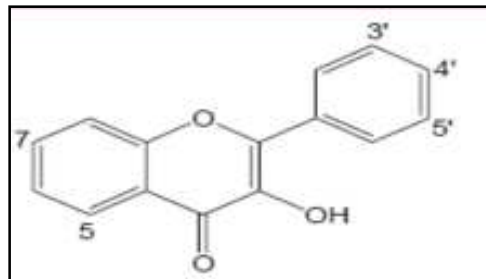


Figure 17 : Structure de base des flavonols^[51].

I.4.2.3. Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous forme libre ou sous formes glycosylées.

Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylées ou Méthoxylées. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. La principale flavanone est : La naringénine.

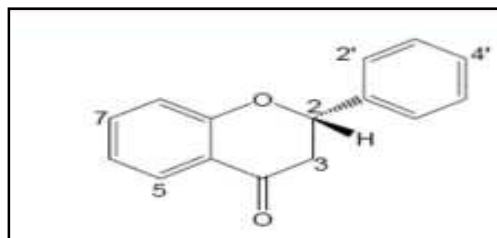


Figure 18 : Structure de base des Flavanones^[21].

I.4.2.4. Anthocyanidines

Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont une double liaison entre les positions 3 et 4. Les plus importants sont : pélargonidine, cyanidine et péonidine.

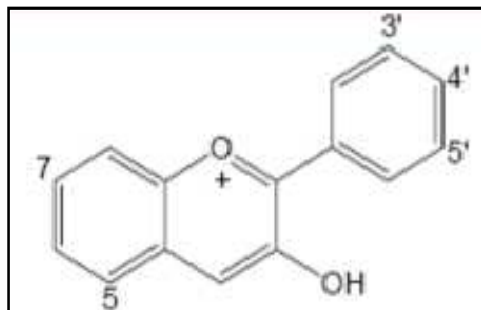


Figure 19 : Structure de base des Anthocyanidines ^[21].

I.4.2.5. Flavanols

Ils se distinguent des flavanones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène. Relié au carbone par une double liaison la plus rencontré est la catéchine ^[52].

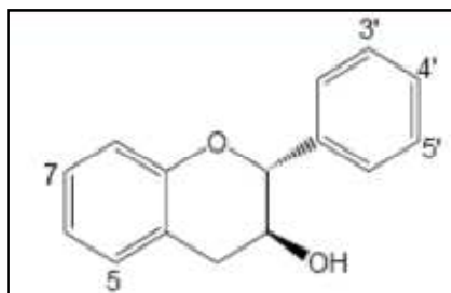


Figure 20 : Structure de base des Flavanols ^[53].

I.4.3 .Répartition

Les flavonoïdes sont localisés dans toutes les parties des végétaux comme les racines, Tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois, certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus ^[54].

I.4.4. Propriétés des Flavonoïdes

Les Flavonoïdes possèdent une activité très importante, ils sont utilisés comme :

- ✓ Antivirales.
- ✓ Antispasmodiques.
- ✓ Antitumorales.
- ✓ Anti agrégation plaquettaire.
- ✓ Antiallergiques.
- ✓ Hypocholestérolémiantes.
- ✓ Anti-inflammatoires.
- ✓ Anti-hypertensives.
- ✓ Anti-oxydante et antimicrobiennes^{[55]. [56]. [57]. [58][59]}.

I.4.5. Les flavonoïdes existant dans l'espèce *retama sphaerocarpa*

Quelques flavonoïdes qui se trouvent dans l'espèce *R. sphaerocarpa*^{[60][61]}.

- 7 hydroxy- 6' méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside.

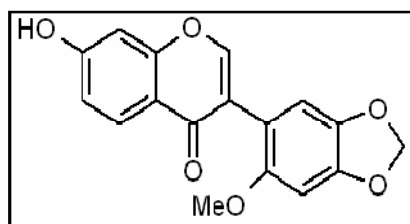


Figure 21 : Structure de 7 hydroxy- 6' méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside

- Daidzéine

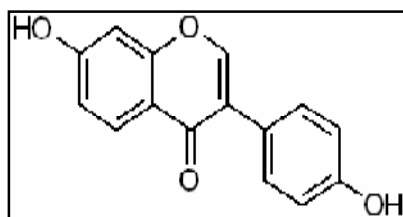


Figure22 : structure de Daidzéine.

- Ephedroidine

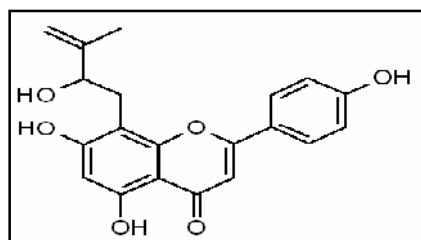


Figure 23 : structure d'Ephedroidine.

I.4.6. Biosynthèses de quelque flavonoïde de la plante *retama sphaerocarpa*

La Daidzéine est un extrait d'isoflavone qui biosynthétisée via une branche de la voie générale des phénylpropanoïdes, voie qui produit notamment les flavonoïdes chez les plantes supérieures. Cette voie débute à partir d'un acide aminé, la phénylalanine qui est transformée en acide cinnamique ou l'un de ses dérivés, lui-même transformé en dérivé de l'acide paracoumarique qui donne une chalcone, précurseur de la plupart des flavonoïdes.

- Biosynthèses de Daidzéine [136].

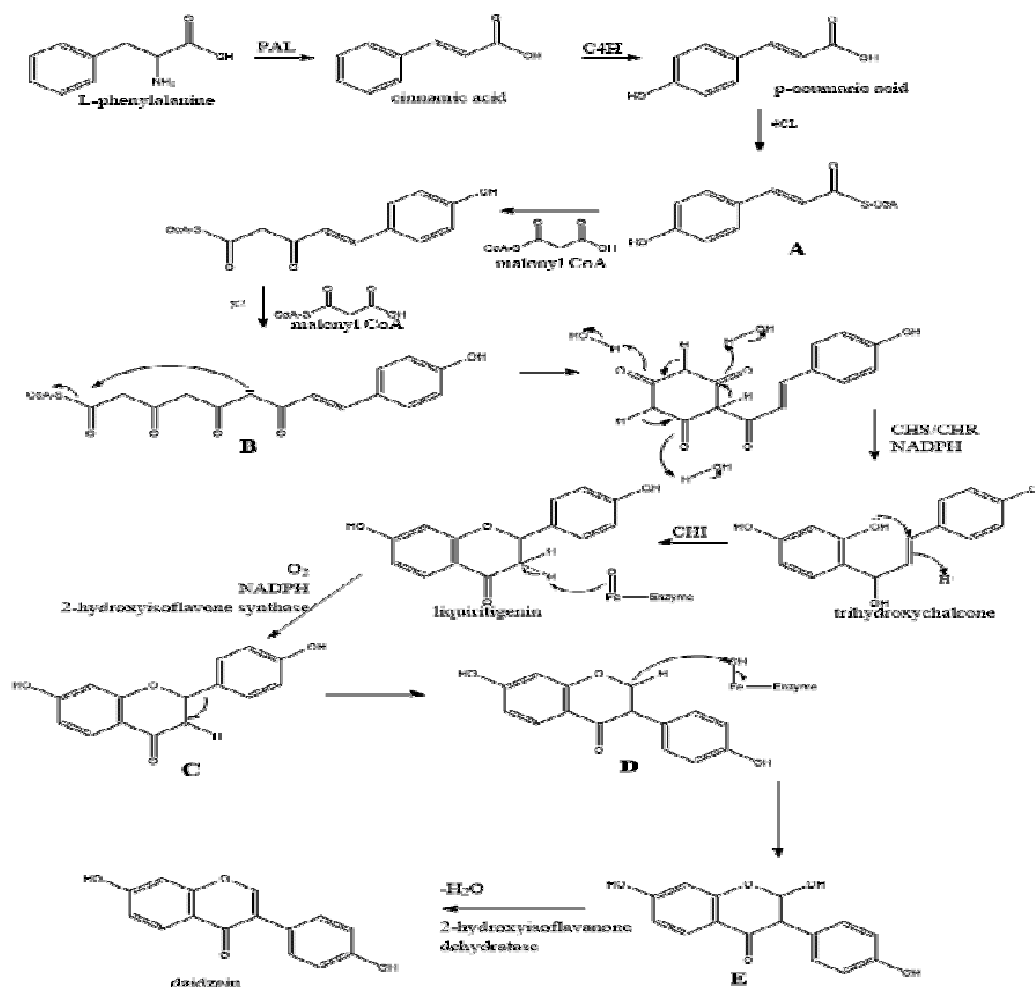


Figure 24 : Biosynthèses de Daidzéine.

I.5. Technique d'extraction

Il existe différentes méthodes d'extraction parmi eux :

I.5.1. Infusion

C'est une décoction durant laquelle le solide est plongé dans un solvant chauffé sans

Qu'il soit bouilli suivie d'un refroidissement du mélange. La préparation de thé repose sur le

Principe de l'infusion ^[62].

I.5.2. Décoction

Après avoir laissé tremper 24h à température ambiante, on porte à ébullition et on laisse frémir l'eau pendant environ 30 min. Laisser reposer 12h la préparation et filtrer ensuite ^[63].

I.5.3. Macération

Dans cette méthode la matière végétale broyée est mise dans un récipient fermé en Présence d'un solvant d'extraction pendant au moins 3 jours sous agitation et à température ambiante ^[64].

L'opération est bien généralement lente et à rendement souvent moyen mais c'est la seule méthode utilisable pour l'extraction de molécules fragiles (Thermosensibles). Une macération efficace peut durer environ 3 à 10 jours ce qui implique.

Quelques inconvénients: fermentation ou contamination bactérienne (dans le cas où le solvant utilisé est l'eau) ce qui entraîne une dégradation rapide des molécules actives ^{[62]. [65]. [66]}. Cette méthode est nous avons utilisée dans notre travail.

Chapitre II:
Méthodes d'analyse

II. Techniques d'analyses

La séparation, purification et l'identification d'une espèce chimique ou biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité, de sa concentration et sa structure on utilise diverses techniques analytiques sélectives et sensibles comme la chromatographie et les méthodes spectrales d'analyses.

II.1.Méthodes de séparation

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation de variées substances chimiques dans un mélange complexe (extrait d'une plante) ^[67]. Cette méthode est appliquée, à la production pour l'isolement ou la purification de substances, et dans l'analyse chimique, afin de l'identification ou la détermination quantitative ^[68]. Elle est utilisée dans diverses sciences de la chimie. Le classement de méthodes chromatographiques varie selon la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

II.1.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) Thin-layer chromatography (TLC) (en anglais)

II.1.1.1.Définition

C'est un procédé simple, facile, rapide et peu coûteuse ; qui permet la séparation d'un mélange non volatil^[69] de substance par distribution différente de ses composants individuels entre une phase stationnaire(un substrat inerte tel qu'une feuille d'aluminium, qui est revêtu d'une fine couche de matériau adsorbant, généralement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium (alumine) ou de la cellulose) et une phase mobile(un solvant ou un mélange de solvants) ^[70]. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules de l'extrait au cours de son fractionnement sur colonne et pour évaluer la complexité des fractions ^[71].

II.1.1.2. Présentation du matériel

Nous avons ici besoin de ces différents éléments :

- ✓ Cuve : c'est un récipient en verre de forme variable et fermé par un couvercle étanche dans lequel en place un éluant.
- ✓ papier absorbant.

- ✓ plaque de CCM (silice) : c'est la phase stationnaire ou fixe. La plaque chromatographique. Plaque (support) en plastique (PETE), métallique (Al) ou encore en verre. Recouverte d'une fine couche de gel de silice (poudre blanche).
- ✓ Capillaire : sont de simples dispositifs de transfert de liquide étalonnés pour distribuer des microquantités d'échantillon pour des applications de laboratoire.
- ✓ éluant : aussi appelé la phase mobile. C'est souvent un solvant ou un mélange de solvants dans des proportions bien établies. L'éluant ne doit pas réagir avec les constituants à un analyseur.
- ✓ L'échantillon : d'un analyseur est déposé sur la ligne de dépôt.

II.1.1.3. Le principe de la CCM

Il s'agit d'une technique d'analyse qui s'appuie sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. La séparation des substances chimiques est migrée sur la phase stationnaire polaire, dans une phase mobile ^[72] avec une hauteur variant et spécifique en fonction de leur affinité pour les deux phases, c'est ce qui permet de l'identifier par comparaison avec l'élévation d'une espèce témoin selon leur R_f (Rapport frontal : rapport de la distance de migration du composé par rapport à celle du solvant) ^[71].

II.1.1.4. Technique et le protocole

L'utilisation de la CCM comporte quatre étapes :

a- Le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile :

- Repose sur :

- ✓ La solubilité: on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
- ✓ La polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre.

b- L'application du produit :

- ✓ L'échantillon doit être soluble dans l'éluant.
- ✓ Effectuer les dépôts souhaités à l'aide de capillaires on dépose sur la ligne de dépôt une petite goutte de l'échantillon à une distance de 1 à 1,5 centimètre du bord de la plaque ^[73].

c- le développement de la couche mince :

Préparation de la cuve: On verse dans la cuve à chromatographie l'éluant afin d'obtenir une hauteur de liquide d'environ 1 cm On bouche la cuve afin de rechercher l'évaporation des solvants. Placer verticalement la plaque dans la cuve, et la refermer rapidement. Au départ, l'éluant ne doit pas toucher les dépôts pour migrer de façon égale sur la phase stationnaire. Cette condition nous permettra de comparer ou de mesurer avec plus de précision les distances de migration des produits sur des plaques différentes [74].

d- la visualisation ou la révélation des produits :

- ✓ Le solvant contenu dans la cuve monte le long de la plaque c'est l'étape d'élution. Attendre que l'éluant arrive à environ 1 cm du haut de la plaque, puis on retire la plaque, on repère par un trait la hauteur maximale atteinte par l'éluant puis séché le chromatogramme.
- ✓ Le chromatogramme obtenu est directement exploitable puisque les taches sont colorées.
- ✓ Si les taches sont incolores, il est nécessaire de faire apparaître: c'est l'étape de révélation.
- ✓ Pour cela on utilise une lampe à Le chromatogramme ultraviolet, des vapeurs de di-iodé ou une solution de permanganate de potassium [75].

II.1.1.5. Rapport frontal de la CCM

Le R_f est caractéristique d'une espèce chimique pour un éluant et un support donnés. Cette valeur servira d'authentique lors de CCM d'identifications.

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le R_f de rétention factor en anglais qui a été fort habilement traduit comme rapport frontal. Ce R_f est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front du solvant}} = [0 - 1]$$

II.1.1.6. Utilité des CCM

- ✓ CCM analytiques :
- Vérifier la pureté d'un produit, quelques microgrammes suffisent
- Suivre l'avancement d'une réaction
- Vérifier l'efficacité d'une extraction liquide-liquide

- Déterminer l'éluant pour la chromatographie éclair sur gel de silice

- ✓ CCM préparatives :

- Purification de petites quantités de produit. La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

II.1.2. La chromatographie sur colonne (C. C)

II.1.2.1. Définition

C'est une chromatographie d'adsorption permet la séparation des composés et purifier un produit de réaction. C'est la méthode standard de purification dans un laboratoire de chimie organique. Il existe deux types de CC :

- Chromatographie par gravité.
- Chromatographie éclair ("flash").

II.1.2.2. Le principe de CC

Est basée sur le même principe que la CCM, sauf que le gel de silice est situé dans une colonne et non sur une plaque. Selon la nature de l'éluant et le contenu de la colonne, les constituants du mélange migrent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés. Certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres ^[76].

II.1.2.3. Facteurs dont dépend la séparation

Quatre facteurs interviennent:

- L'adsorbant.
- L'éluant.
- La dimension de la colonne.
- La vitesse d'élution.

II.1.2.4. Remplissage de la colonne

- Remplissage par voie humide
- Remplissage par voie sèche.

II.1.2.5. Inconvénients

- Des grandes quantités d'éluant sont nécessaires.
- La durée de l'élution peut être longue.
- La détection des composés demande une attention constante.

II.1.3. La Chromatographie sur papier

II.1.3.1. Définition

La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage et la plus ancienne que les autres techniques. La phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ; quant à la phase mobile est un solvant organique et l'eau ^[76]. Elle est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels ^[77].

II.1.3.2. Principe

Cette chromatographie liquide-liquide est fondée sur le (ré) partition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. C'est une technique essentiellement qualitative.

La chromatographie sur papier exploite la polarité des molécules (critère de polarité). Tout dépend du coefficient de partage des molécules selon leurs affinités, dans 2 solvants, dont l'un constitue la phase stationnaire et l'autre la phase mobile. La phase stationnaire est fixée sur un support solide (papier, contenant un solvant polaire = eau) ou gel). Les composés plus solubles dans la phase aqueuse se déplacent lentement. Ceux qui sont solubles dans la phase organique migrent plus vite ^[78].

II.1.3.3. Les inconvénients de la CP par rapport à le CCM

- ✓ Une durée de développement beaucoup plus longue.
- ✓ Une séparation généralement moins bonne.

II.1.4. Chromatographie liquide haute performance

II.1.4.1. Définition

C'est une méthode utilisée pour l'analyse phytochimique ^[79]. La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés (chiraux ou non) d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification ^[80].

II.1.4.2. Le principe

Les composés à séparer sont dissous dans un ou plusieurs solvants. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Elles interagissent avec la phase stationnaire selon la nature des molécules dans la colonne chromatographique. Une pompe est utilisée pour fournir un écoulement continu et rapide de la transmission de phase mobile. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les analytes dans le mélange d'échantillons dissous sont ensuite séparés en fonction de leur affinité pour les particules enrobées dans la colonne. Les différents solutés sont caractérisés par un pic grâce à un assortiment de détecteurs. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. ^{[81] [82] [83]}
^[84].

II.1.5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

II.1.5.1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes » ^[85]. La plus couramment employée dans l'étude des huiles essentielles. Cette méthode permet également de séparer de faibles quantités des différents composants de l'huile essentielle et l'identification des constituants et l'obtention d'une valeur approximative des concentrations respectives.

L'appareil de CPG comporte trois parties essentielles : injecteur, colonne dans un four et détecteur ^{[86] [87]}.

II.1.5.2. Le principe

C'est une technique de séparation des composés d'un mélange qui repose sur une chromatographie de partage des analytes entre une phase fixe greffée (polaire ou apolaire): liquide ; et une phase mobile gazeuse ^{[87] [88]}. Deux forces donc interviennent dans la séparation des composés volatils pour obtenir un composé au propre, il migre à une vitesse propre :

-Force de rétention: solubilité du composé dans la phase fixe.

-Force d'entraînement: solubilité du composé dans la phase mobile.

L'agitation brownienne apportée par la montée en température du four libérant les composés de cette interaction. Le balayage de la colonne par le gaz vecteur entraîne les composés vers le détecteur

II.1.5.3. L'analyse GC-MS

II.1.5.3.1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, abrégé CPG-SM, ou GC-MS de l'anglais Gas chromatography-mass spectrometry, est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces ^[89].

II.1.5.3.2. Principe

Technique d'analyse qualitative et quantitative pour tout échantillon volatile. Dans un premier temps, cette technique démarre comme une chromatographie en phase gazeuse normale. Un échantillon (sous forme de liquide volatil), est introduit en tête de la colonne dans l'injecteur par une micro seringue. La colonne, balayée en continu par un gaz porteur, va entraîner les différentes composantes de l'échantillon et ainsi les amener à se détacher les unes des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. Une fois séparées, ces différentes composantes sont détectées en sortie de colonne par un détecteur, le spectromètre de masse. Les composantes sont alors introduites directement dans ce dernier qui est relié au chromatographe ^[90].

II.1.5.3.3. Analyse GC-MS des alcaloïdes dans l'espèce *Rétama*

Au total, 31 alcaloïdes ont été enregistrés dans l'extrait des parcelles de différentes parties végétales des trois espèces *Rétama* (tableau 3) : Au moins 21 alcaloïdes ont été détecté dans *R. reatam*, 20 alcaloïdes dans *R. sphaerocarpa* et 27 alcaloïdes chez *R. monosperma*. Les différentes parties de la plante ont été examinées en détail par GLC-MS (Tableau 4) ^[91].

Tableau 3: Profil et teneur en alcaloïdes (alcaloïdes totaux = 100 %) de *Rétama raetam*, *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma*

| Alkaloid | <i>R. raetam</i> | | | | | <i>R. sphaerocarpa</i> | | <i>R. monosperma</i> | |
|---|------------------|-------|-------|-------|---------|------------------------|---------|----------------------|--------|
| | Stems | Roots | Pods | Seeds | Flowers | Stems | Flowers | Stems | Fruits |
| 1: Epilupinine | – | – | – | – | – | tr | – | – | – |
| 2: α-Isosparteine | tr | – | – | – | – | tr | – | tr | – |
| 3: Sparteine ^{a,b,c} | 35.65 | 9.09 | 0.77 | tr | tr | 20.16 | 4.34 | 24.79 | tr |
| 4: Dehydrosparteine | tr | – | – | – | – | tr | – | tr | – |
| 5: Dehydrosparteine | tr | – | – | – | – | tr | – | tr | – |
| 6: β-Isosparteine | 0.80 | 0.98 | 0.63 | tr | tr | – | – | tr | – |
| 7: 11,12-Dehydrosparteine | 0.81 | – | – | – | tr | tr | – | tr | – |
| 8: Ammodendrine ^b | 0.99 | 0.87 | 0.75 | tr | tr | 13.79 | 25.18 | 11.59 | 2.75 |
| 9: Dehydroammodenderine | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 10: N-Methylcytisine ^{a,c} | 9.91 | 20.13 | 4.46 | 5.63 | 10.81 | tr | 6.87 | 4.90 | 12.72 |
| 11: Dehydrocytisine I | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 12: Retamine ^{a,b} | 24.86 | 45.44 | 20.10 | tr | tr | 37.20 | 12.35 | 1.50 | – |
| 13: Dehydrocytisine II | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 14: Cytisine ^{a,b,c} | 0.91 | 6.00 | 36.44 | 94.37 | 54.25 | 5.04 | 24.16 | 7.95 | 58.69 |
| 15: Dehydroretamine | tr | – | – | – | tr | tr | – | tr | – |
| 16: 17-Oxosparteine ^c | tr | – | – | – | tr | tr | – | 2.57 | – |
| 17: α-Isolupanine | – | – | – | – | – | tr | – | tr | – |
| 18: 5,6-Dehydrolupanine ^b | 3.91 | 0.50 | 4.50 | tr | 3.62 | 5.32 | 11.78 | 9.90 | tr |
| 19: Rhombifoline | – | 0.60 | tr | – | – | – | – | tr | tr |
| 20: Lupanine ^{a,b} | 8.73 | 2.15 | 14.32 | tr | 2.26 | 15.40 | 15.32 | 4.24 | tr |
| 21: Aphylline | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 22: N-Formylammodendrine | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 23: N-Carbomethoxycytisine | tr | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 24: 11-Allylcytisine | 0.58 | 1.87 | 4.95 | tr | 6.61 | – | tr | 0.50 | tr |
| 25: 17-Oxoretamine | 0.50 | – | – | – | – | 0.50 | tr | – | – |
| 26: N-Formylcytisine | tr | – | – | – | – | tr | – | tr | – |
| 27: N-Acetylcytisine | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 28: 12α-Hydroxylupanine | tr | – | – | – | – | tr | – | – | – |
| 29: Anagyrene ^{a,b} | 12.35 | 11.92 | 13.08 | tr | 22.55 | 2.59 | tr | 32.06 | 25.84 |
| 30: Dehydrobaptifoline | – | – | – | – | – | – | – | tr | – |
| 31: Baptifoline ^b | tr | – | – | – | tr | tr | – | tr | – |
| Alkaloid content* | 2.56 | 1.36 | 0.55 | 2.00 | 0.57 | 0.82 | 0.13 | 0.70 | 0.21 |

tr = Trace amounts; – = not detected; ^a = known alkaloid of *R. raetam*; ^b = known alkaloid of *R. sphaerocarpa*; ^c = known alkaloid of *R. monosperma*; * = mg/100 mg by weight of dry material for *R. raetam*; * = mg/100 mg by weight of fresh material for *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*.

Tableau 4: Les différentes parties de la plante ont été examinées en détail par GLC-MS.

| 13: Dehydrocytisine II | 1985 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O | 188(73) | 160(18), 159(5), 147(40), 146(100), 117(12), 78(9) | 1, 4 |
|----------------------------------|------|--|----------------|---|----------|
| 14: Cytisine | 1990 | C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O | 190(56) | 160(23), 148(30), 147(80), 146(100), 134(36), 117(11), 109(21), 104(9), 93(9), 82(20), 77(9), 68(10), 44(73) | 1, 4 |
| 15: Dehydroretamine | 2017 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O | 248(22) | 229(12), 205(5), 150(40), 135(30), 134(30), 122(16), 114(13), 98(58), 97(100), 96(60), 80(14), 68(13), 54(9) | |
| 16: 17-Oxosparteine | 2070 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O | 248(38) | 220(20), 219(11), 191(11), 150(20), 137(25), 136(50), 123(22), 110(75), 98(85), 97(100), 96(28), 84(27), 69(15), 55(28) | 4, 11 |
| 17: α-Isolupanine | 2105 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O | 248(24) | 247(8), 150(29), 149(40), 148(25), 136(100), 134(25), 124(55), 110(18), 98(48), 97(30), 84(25), 83(23), 67(20), 55(45) | 2, 4 |
| 18: 5,6-Dehydrolupanine | 2128 | C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O | 246(20) | 217(3), 203(3), 189(3), 148(6), 134(10), 110(5), 98(100), 97(35), 84(8), 68(7), 55(8) | 3, 4, 12 |
| 19: Rhombifoline | 2155 | C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O | 244(0.1) | 204(10), 203(98), 160(18), 146(12), 117(6), 98(16), 58(100), 55(15) | 4, 13 |
| 20: Lupanine | 2165 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O | 248(28) | 247(25), 219(5), 205(3), 191(2), 150(35), 149(51), 148(18), 136(100), 122(12), 110(23), 98(29), 97(24), 84(17), 67(10), 55(30) | 4, 11 |
| Alkaloid | RI | Formula | M ⁺ | Characteristic Ions (relative abundance in %) | Ref. |
| 1: Epilupanine | 1416 | C ₁₀ H ₁₉ NO | 169(70) | 168(60), 152(100), 138(75), 98(25), 97(90), 96(16), 83(98), 82(35), 55(57) | 1, 4 |
| 2: α-Isosparteine | 1712 | C ₁₅ H ₂₆ N ₂ | 234(23) | 193(18), 152(6), 150(5), 137(50), 136(35), 122(10), 110(18), 98(100), 97(18), 96(8), 84(15), 83(8), 67(9), 55(12) | 1, 4 |
| 3: Sparteine | 1785 | C ₁₅ H ₂₆ N ₂ | 234(15) | 205(5), 193(27), 176(5), 150(16), 137(90), 136(45), 122(19), 110(30), 98(100), 97(50), 84(30), 70(12), 67(11), 55(24) | 2, 4 |
| 4: Dehydrosparteine | 1810 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ | 232(50) | 203(6), 191(12), 189(13), 175(23), 148(30), 136(24), 135(42), 134(100), 122(18), 110(8), 98(89), 97(53), 96(20), 84(14), 67(10), 55(14) | 3 |
| 5: Dehydrosparteine | 1825 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ | 232(50) | 203(11), 191(18), 189(30), 175(18), 148(32), 136(23), 135(45), 134(100), 122(19), 110(10), 98(90), 97(30), 96(15), 84(6), 67(9), 55(14) | 3 |
| 6: β-Isosparteine | 1830 | C ₁₅ H ₂₆ N ₂ | 234(15) | 205(3), 193(15), 150(10), 137(100), 136(30), 122(12), 110(18), 98(70), 97(30), 84(12), 67(5), 55(10) | 4, 5 |
| 7: 11,12-Dehydrosparteine | 1838 | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ | 232(33) | 203(2), 191(4), 175(18), 148(20), 136(19), 135(37), 134(100), 122(11), 110(9), 98(35), 97(80), 96(45), 84(10), 68(10), 67(10), 55(12) | 4, 5 |
| 8: Ammodendrine | 1865 | C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O | 208(48) | 207(27), 191(45), 179(45), 165(100), 152(23), 137(45), 136(72), 123(80), 122(51), 110(80), 109(78), 108(52), 94(52), 84(31), 80(40), 55(21), 43(60) | 4, 6 |
| 9: Dehydroammodendrine | 1935 | C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O | 206(47) | 205(12), 163(100), 149(6), 135(12), 122(8), 108(20), 84(15), 80(5), 55(10), 43(20) | 7, 8 |
| 10: N-Methylcytisine | 1952 | C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O | 204(15) | 160(5), 146(6), 117(2), 109(3), 96(3), 58(100) | 1, 4 |
| 11: Dehydrocytisine I | 1970 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O | 188(68) | 160(53), 159(25), 148(62), 146(50), 136(10), 135(26), 134(100), 77(18), 57(14) | 4, 9 |
| 12: Retamine | 1973 | C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O | 250(3) | 233(6), 232(11), 207(15), 150(11), 134(30), 114(10), 98(100), 97(31), 96(15), 84(15), 70(10), 55(10) | 4, 10 |

II.2.Méthodes d'indentification

Une fois que l'espèce chimique intéressante a été extraite, les chercheurs doivent s'assurer de l'identification correcte des espèces. Pour déterminer la composition d'un échantillon, les chercheurs sont utilisés des différentes méthodes spectrométriques permettant d'accéder à la composition et à la structure de la matière (la spectrométrie des rayonnements et la spectrométrie de masse) ^[92].

La spectroscopie est la science qui traite des interactions de différents types de rayonnement avec la matière. La spectrométrie, quant à elle, concerne l'instrumentation et les mesures pour des études spectroscopiques. Les techniques spectroscopiques peuvent être classées selon le processus de mesure : absorption, émission et diffusion du rayonnement électromagnétique ^[93].

II.2.1. La spectroscopie UV-Visible

II.2.1.1. Définition

La spectrométrie UV-Visible repose sur l'interaction de la matière et du rayonnement électromagnétique dans le domaine 180-800 nm ^{[94] [95]}. Elle permet de déterminer les propriétés optiques (transmittance, réflectance et absorbance) des liquides et des solides et de déterminer la concentration d'une substance ^[96].

II.2.1.2. Principe

Une transition électronique correspond au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée vers une orbitale moléculaire excitée vacante, par absorption d'un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité ^{[95] [97] [98]}.

II.2.1.3. Le spectre d'absorption dans l'U.V-visible des alcaloïdes

Le spectre d'absorption dans l'U.V. ou le visible (spectre électronique) fournit des indications sur certains éléments structuraux ou « chromophores » comportant des électrons engagés dans des liaisons multiples et des cycles « aromatiques ». Le tracé obtenu – coefficient d'absorption, ou absorbance, en fonction de la longueur d'onde du rayonnement – est parfois suffisamment caractéristique pour identifier le type structural, comme dans le cas des alcaloïdes indoliques ou isoquinoléiques ^[99].

II.2.1.4. Le spectre d'absorption dans l'U.V-visible des flavonoïdes

La plupart des spectres UV-visible sont obtenus dans le méthanol (ou l'éthanol), solvant standard, auquel on ajoute ensuite différents réactifs du type NaOCH₃, NaOC₂H₅, H₃B₃O₃, AlCl₃ et HCl qui permettent de mettre en évidence les divers substituants du squelette de base. Les spectres de la plupart des flavones et flavonols présentent deux bandes d'absorption complexes dans la région UV-visible: une bande qui apparaît entre 290 et 385 nm et une bande vers 240-285 nm ^[100].

II.2.2. La spectroscopie Infrarouge (IR)

II.2.2.1. Définition

Parmi les méthodes à la disposition du chimiste pour l'analyse structurale, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et l'infrarouge (IR) jouent des rôles complémentaires : la RMN permet de connaître l'enchaînement des atomes, l'infrarouge les groupes fonctionnels présents dans les molécules. La spectroscopie IR est un outil important et populaire pour élucidation structurale et identification des composés organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles par la mesure d'absorption de différentes fréquences IR ^{[101][102][103]}.

Un spectromètre IR se compose de trois composants de base: la source de rayonnement, le monochromateur et le détecteur ^[101].

II.2.2.2. Principe

La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur l'absorption du rayonnement électromagnétique à des longueurs d'onde comprises entre 780 et 2500 nm. Différents groupes fonctionnels absorbent les fréquences caractéristiques puis le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration (déformation, élongation) spécifiques de liaisons chimiques. Le spectre est constitué de bandes que l'on appelle bandes d'absorption ^{[104][105]}.

II.2.2.3. Le spectre d'absorption dans l'infrarouge (I.R.) des alcaloïdes

Le spectre d'absorption dans l'infrarouge (I.R.) est lié aux différentes liaisons interatomiques de l'édifice moléculaire en décelant surtout les « vibrations de valence » (OH, NH, CO, CN, C=C, liaisons des cycles aromatiques) ^[99].

II.2.2.4. Le spectre d'absorption dans l'infrarouge (I.R.) des flavonoïdes

L'étude des propriétés spectrales infrarouges des flavonoïdes abordent principalement le comportement de la fréquence d'élongation carbonyle $\nu(\text{C}=\text{O})$ et la position des fréquences d'élongation des groupements hydroxyles $\nu(\text{OH})$ pour diverses flavones et hydroxy flavones.

Certaines fréquences de déformation des C-H aromatiques hors du plan sont également répertoriées pour un certain nombre de flavanones et flavones ^[100].

II.2.3. La spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN)

II.2.3.1. Définition

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple ^1H , ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P , ^{129}Xe ...), placé dans un champ magnétique ^[107] ^[108]. Elle est utilisée par plusieurs disciplines par exemple une méthode non invasive et non ionisante d'étude du corps humain; physique et chimie ou en biochimie ^[108].

Différentes techniques peuvent être utilisées :

a) RMN monodimensionnelle :

- **RMN proton (^1H) :** Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton ^[109].
- **RMN carbone (^{13}C) :** Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires ^[109].

b) RMN bidimensionnelles:

La RMN-2D est une technique plus efficace et précise que la RMN-1D, elle peut :

- Simplifier l'analyse des cas plus complexes ou ambiguës telles que les protéines.
- Obtenir des informations structurales n'est pas accessible par les méthodes RMN-1D
- Expériences de corrélation permettant de faire le lien entre certains noyaux de la molécule. Couramment utilisé pour la détermination de structure de grosses molécules.

II.2.3.2. Principe

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. Les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C) possèdent un moment magnétique nucléaire. En présence d'un champ magnétique externe la spectroscopie RMN consiste à étudier les transitions entre 2 niveaux d'énergie très proches d'un noyau. Résultats de l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radio fréquences un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux ^[110]
^{[111][112]}.

II.2.3.3. Le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) des alcaloïdes

Par le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN), on détermine ainsi, avec une relative précision, les groupements fonctionnels hydrogénés (méthyles CH_3 liés à C, N ou O ; $-\text{CH}=\text{N}$; $>\text{NH}$; CH des noyaux aromatiques) et leur proximité, grâce au phénomène du couplage entre protons voisins, analysable par des techniques avec appui informatique ^[99].

II.2.3.4. Analyse spectrale ^{13}C RMN et ^1H RMN des deux majeurs alcaloïdes d'espèce *Rétama*

La structure de rétamine était déterminée par MS et ^{13}C RMN (tableaux 4 et 5) comme (+) rétamine ^{[113][114]}.

L'alcaloïde cytisine était identifié par MS, ^1H - et ^{13}C RMN (tableaux 4 à 6) sous forme de (-) cytisine ^{[113][115]}.

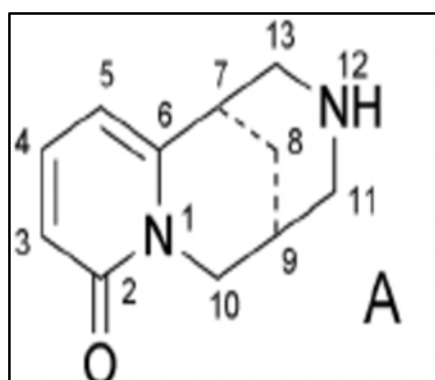


Figure 25: Structure de Cytisine

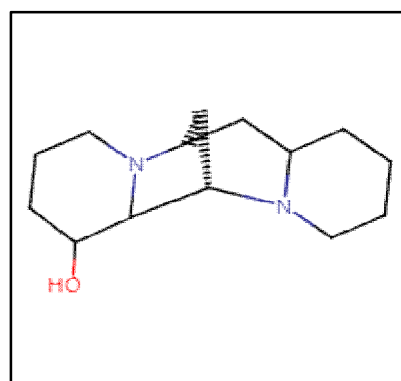


Figure 26: Structure de rétamine

Tableau 5: données spectrales ^{13}C RMN des composés 12 (+rétamine)* et 14 (-cytisine)* (75 MHz, CDCl_3).

| C | retamine | cytisine |
|----|----------|----------|
| 2 | 65.18 | 163.69 |
| 3 | 25.78 | 116.69 |
| 4 | 24.57 | 138.78 |
| 5 | 29.27 | 104.98 |
| 6 | 66.43 | 151.11 |
| 7 | 33.21 | 35.64 |
| 8 | 28.77 | 26.33 |
| 9 | 32.60 | 27.80 |
| 10 | 62.32 | 49.75 |
| 11 | 67.07 | 52.99 |
| 12 | 71.04 | — |
| 13 | 31.33 | 53.98 |
| 14 | 20.03 | — |
| 15 | 54.94 | — |
| 17 | 52.87 | — |

* Optical rotation was determined experimentally.

Tableau 6: données spectrales ^1H Rendu composé 14 (- cytisine) (300 MHz. CDCl_3).

| H | cytisine |
|-------------|--------------------------------|
| 3 | 6.42, 1H, <i>dd</i> (1.3, 7.7) |
| 4 | 7.26, 1H, <i>dd</i> (6.3, 9) |
| 5 | 5.97, 1H, <i>dd</i> (1.2, 5.7) |
| 7 | 2.87, 1H, <i>br s</i> |
| 8 | 1.92, 2H, <i>br s</i> |
| 9 | 2.28, 1H, <i>m</i> |
| 10 α | 3.86, 1H, <i>dd</i> (5.7, 9.8) |
| 10 β | 4.08, 1H, <i>d</i> (15.6) |
| 11 | 2.93–3.08, 2H, <i>m</i> |
| 13 | 2.93–3.08, 2H, <i>m</i> |
| N–H | 1.88, 1H, <i>br s</i> |

Figures in parentheses are coupling constants in Hz.

II.2.4. La spectrométrie de masse (SM) :

II.2.4.1. Définition

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse très puissante et très sensible mais destructive permettant d'analyser des composés organiques solides, liquides ou gazeux (elle renseigne sur la facilité avec laquelle les liaisons peuvent se rompre dans la molécule analysée). Par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique avec une très grande précision elle permet de déterminer la masse moléculaire. Aussi on peut réaliser des analyses qualitatives et quantitatives ^{[116][117]}.

Le couplage de la spectrométrie de masse et les techniques séparatives telles que la chromatographie en phase gazeuse, en phase liquide augmenté les performances de SM pour déterminer des structures de molécules complexes telles que les protéines ^[118].

II.2.4.2. Principe

La spectrométrie de masse est fondée sur la séparation et la détection d'ions(en fonction de leur rapport masse/charge (m/z)) formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision. Ces ions proviennent de la molécule à analyser. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. En raison des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formé des ions fragments caractéristiques. Puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire ^{[119][120]}.

II.2.4.3. La spectrométrie de masse (SM) des certains alcaloïdes d'espèce Rétama.

1-Spartéine

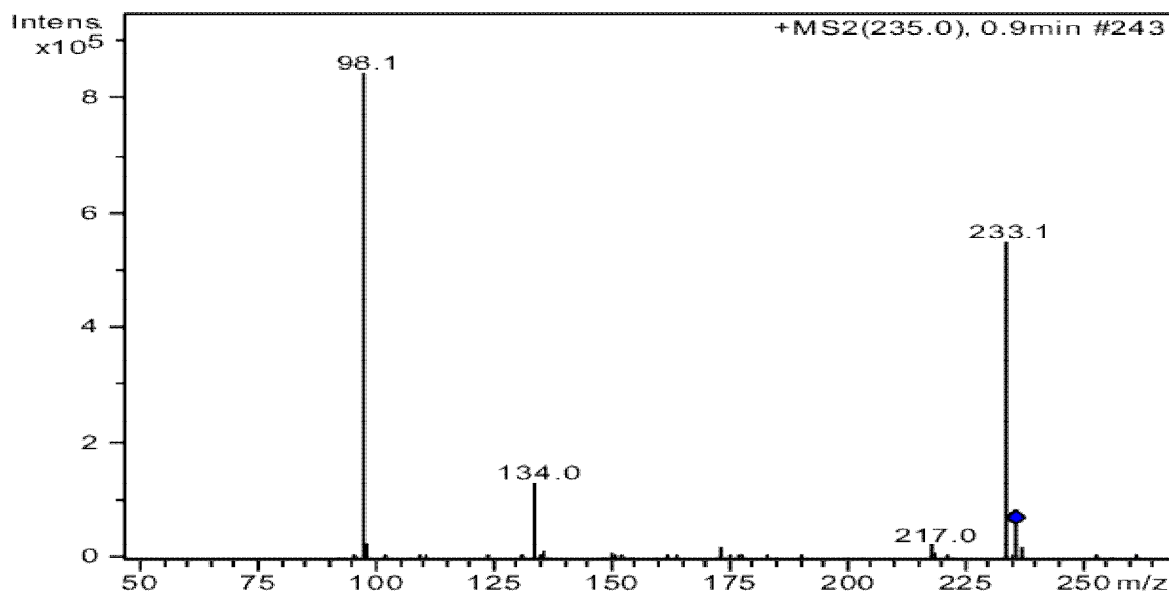


Figure 27 : Le spectre de masse (SM) de spartéine

2-cytisine

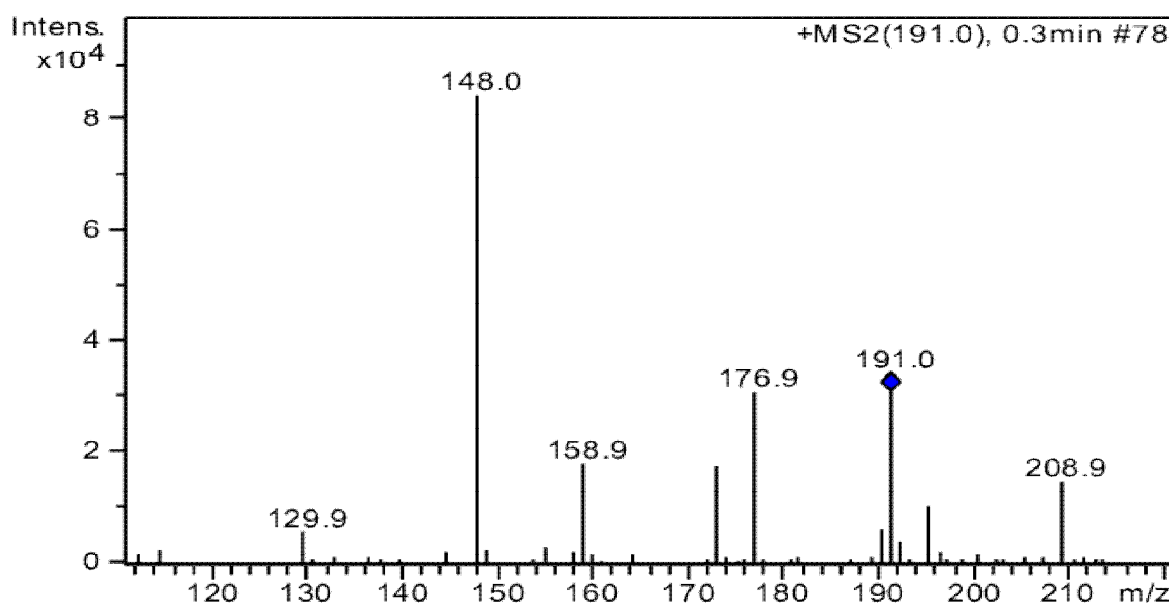


Figure 28 : Le spectre de masse (SM) de cytisine

Partie Pratique

Chapitre III
Matériel et méthodes

III.1. Matériels végétaux

Dans ce travail, nous avons étudié la partie aérienne de la plante *rérama sphaerocarpa*.

Rétama sphaerocarpa été récoltée de la région de Maadid, à 20 Km de la wilaya de M'silla durant le mois de mars.

III.1.1. Matériels de laboratoire

- Verreries: Entonnoir, Erlenmeyers, Béchers, Epprouvettes graduées, Tubes à essais,
- Pompe sous vide.
- Büchner.
- Bain marie.
- Evaporateur rotatif.
- Pipettes pasteur.
- Balance.
- Spatules.

III.1.2. Solvants et réactifs

- Ethanol (C₂H₅OH) (97%).
- Trichloride d'aluminium (AlCl₃).
- Chlorure de fer (FeCl₃) (1%).
- Diéthyle éther (C₂H₅OC₂H₅).
- Acétate d'éthyle (C₄H₈O₂).
- N-butanol (C₄H₁₀O).
- Chloroforme (CHCl₃).
- Acide chloridrique (HCl) (5%).
- L'ammoniaque (NH₄OH) (25%).
- Sulfate de sodium (Na₂SO₄).
- Réactif de Dragendorff.

III.2.Méthodes

III.2.1. Préparation du matériel végétal

Après la récolte, nous séchons la plante à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant plusieurs jours, On broyer la partie aérienne jusqu'à obtenir à une poudre grossière.



Figure 29: la partie aérienne de *rétama sphaerocarpa* après broyage.

III.2.2.Extraction

On utilise deux méthodes d'extraction :

- Extraction solide-liquide.
- Extraction liquide-liquide.

III.2.2.1.Extraction solide-liquide

Il y a trois expériences d'extraction solide-liquide.

III.2.2.1.1.Extrait aqueuse

10 g de plante sont immergées dans 70,5 ml de solvant d'extraction (H₂O), puis on met dans un bain marie avec une agitation de 15 min à la température inférieure de 70°C et laisser pendant 24 heures, puis le surnageant est récupéré et filtré à l'aide de Büchner.

III.2.2.1.2.Extrait hydroalcoolique

Dans un bûcher on met 10 g de la plante avec 52,5 ml d'éthanol et 22,5 ml d'eau distillée (EtOH 70% /H₂O 30%), dans un bain marie à température inférieure de 70°C pendant 15 min et attendre 24 heures, puis filtration.

III.2.2.1.3.Extrait éthanolique

Les extraits éthanoliques ont été obtenus par macération (24 heures) de 20 g de matériel végétal pulvérisé dans 100 ml d'éthanol. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Les filtrats obtenus par Büchner sont alors évaporés à l'aide d'un rotavapeur.

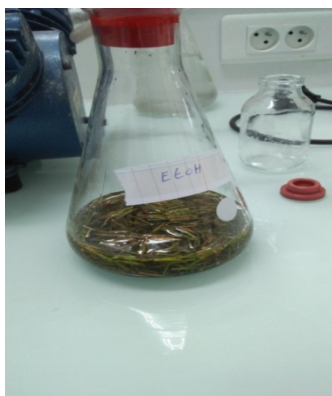


Figure 30 : extraction éthanolique.



Figure 31 : filtration sous vide.

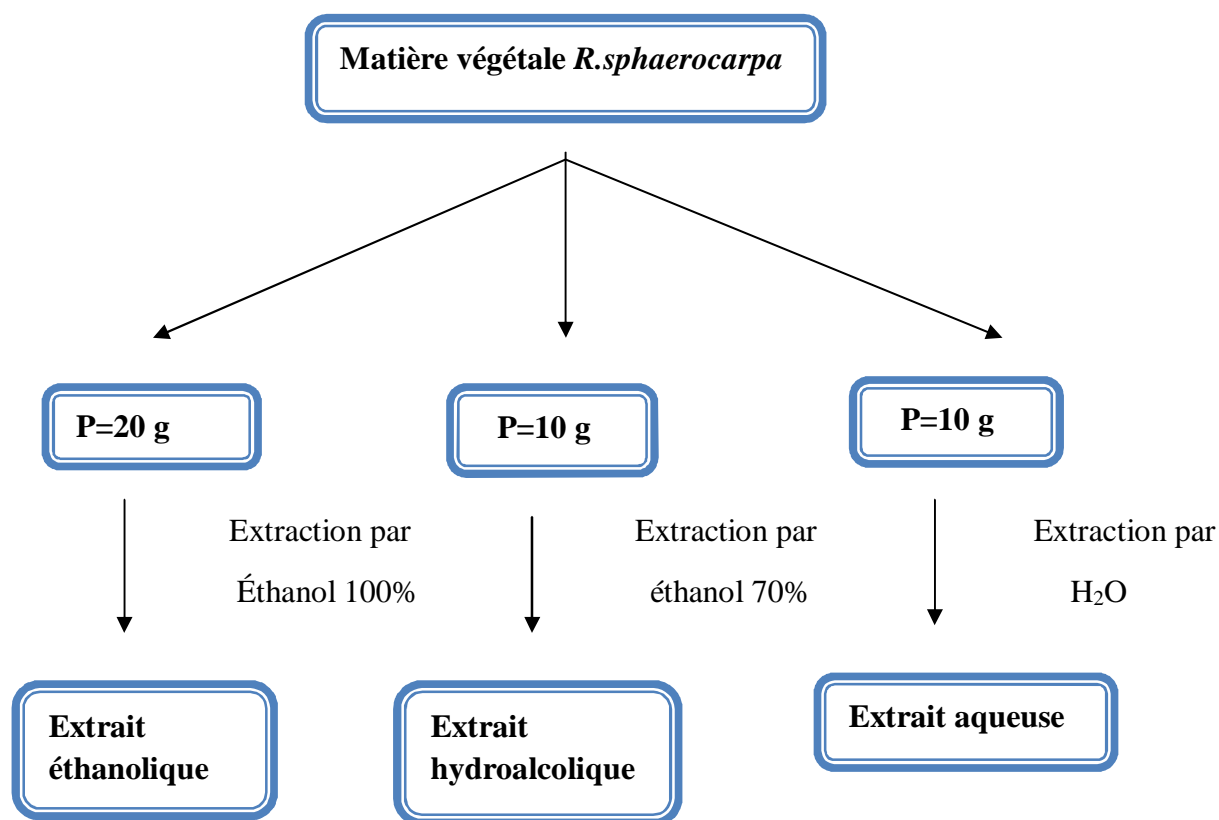


Figure 32 : Protocol d'extraction d'espèce *R. sphaerocarpa*.

III.2.2.2. Extraction liquide-liquide

L'extrait éthanolique qui nous avons évaporé est récupéré avec 100 ml d'éthanol, et divisé en deux 50 ml réserver pour la recherche des alcaloïdes et 50 ml pour la recherche des flavonoïdes dans cette plante.

a. Extraction des alcaloïdes

50 ml d'extrait éthanolique, on l'acidifie par HCl 5%, et on laisse pendant 24 heure, qui permet le dépôt des composés alcaloïdes. L'extrait acidifié subit une filtration à l'aide d'un papier filtre, Puis on fait l'extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter par les solvants suivants :

▪ Extraction par Di éthyle éther

Dans une ampoule à décanter, on ajoute 50 ml di éthyle éther à l'extrait, pour séparer les composés à faible polarité. Ensuite, nous faisons le processus de secouage plusieurs fois. Après l'agitation et décantation qu'obtient deux phases, phase di éthyle éther et phase aqueuse qui subit une extraction liquide-liquide 3 fois par le même solvant, et la phase aqueuse récupéré dans un Erlenmeyers.

On ajoute quelque goutte de solution NH_4OH 25% jusqu'à le pH= 9-10, pour obtenir la solution qui doit être traité par le chloroforme (solution alcaline).

▪ Extraction par chloroforme

Le chloroforme est un solvant organique plus polaire que le précédent. Il permet d'entraîner les composés naturels de faible polarité tels que les alcaloïdes.

50 ml de chloroforme sont ajoutés à la phase aqueuse préalablement traitée par di éthyle éther. Le tout est contenu dans une ampoule à décanter.

Après agitation et décantation on observe deux phases (aqueuse et organique), on répète l'opération 3 fois, chaque opération, la phase organique récupéré puis on ajoute une quantité de Na_2SO_4 . Puis filtration et évaporation.



Figure 33 : Elimination de solvant par évaporation rotatif.

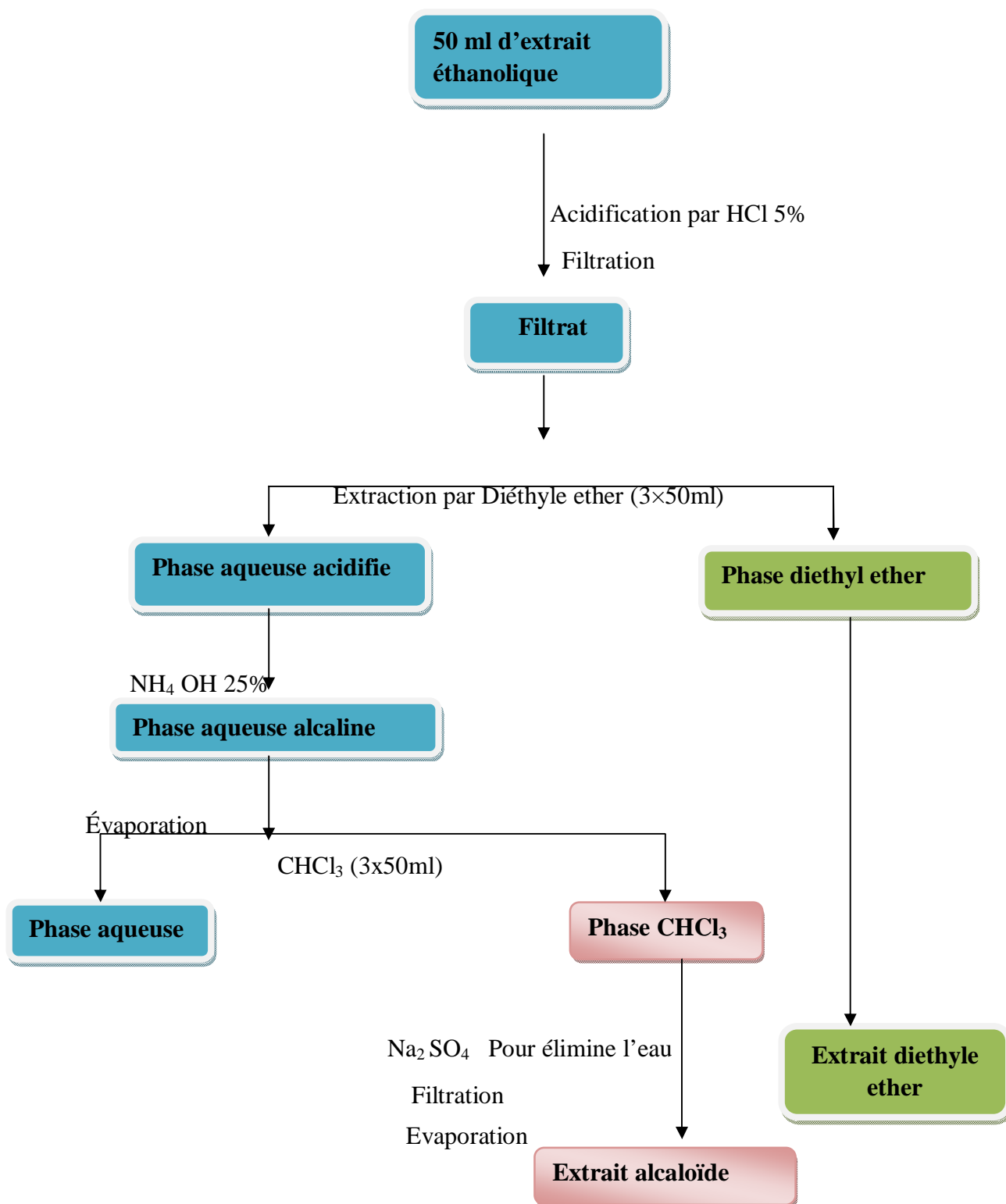


Figure 34 : Protocole d'extraction des alcaloïdes.

Extraction des flavonoïdes

- ✚ On traite l'extrait éthanolique (50 ml) trois fois avec 50 ml di éthyle éther pour extraire les composés non polaire.
- ✚ la phase aqueuse est à nouveau extraite avec un second solvant qui est acétate d'éthyle. Où on ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle à trois fois.
- ✚ La phase aqueuse est également traitée avec du n- butanol, et ce processus est répété trois fois avec 50 ml de butanol, Pour obtenir la phase butanol après évaporation.

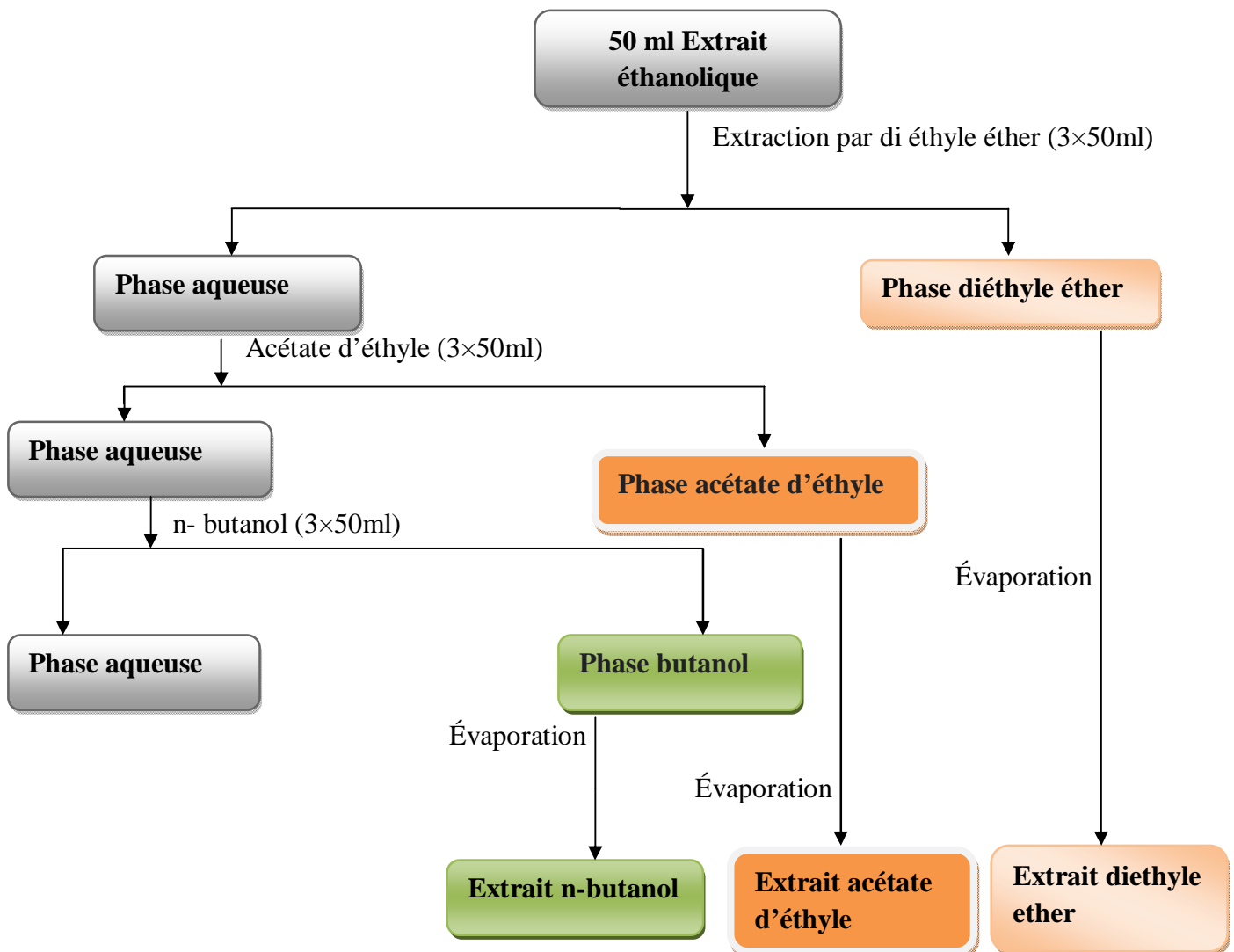


Figure 35 : Protocol d'extraction des flavonoïdes.

III.2.3. Screening phytochimique

III.2.3.1. Test de tanins

On Prendre 5 ml d'extrait éthanolique avec quelque goutte de $FeCl_3$ (1%) dans un tube à essai. Après l'agitation de l'extrait, on observe formation de couleur verdâtre qui indique l'existence de tanins.

III.2.3.2. test des stérols et triterpène

Dans un tube à essai on prendre 10 ml d'extrait chloroformique avec des goutte d'anhydride d'acétate et acide sulfurique, Après l'agitation de l'extrait, on observe formation couche de couleur rouge, ce qui indique la présence des stérols et triterpène.

III.3. Activité antibactérienne

III.3.1. Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes vivants, au même titre que les virus et les champignons. Elles sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs, responsables de maladies plus ou moins graves.

Les bactéries sont classifiées selon la coloration de Gram, la capacité de coloration variant selon la composition de leur paroi. Ainsi, les bactéries colorées en bleu-violet seront dites à Gram positif et celles en rose à Gram négatif^{[121][122]}.

Pour Evaluer de l'activité antibactérienne des composés alcaloïdes et flavonoïdes, On a choisi de travailler sur deux espèces pathogènes qui sont; le *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

A. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus est une bactérie à gram positif du genre coques, on la trouve isolée ou regroupée sous forme de grappe de raisin, ce sont aussi des cocci non mobiles, de 0,8 à 1 μ de diamètre, Résistance aux antibiotiques^[123].

On le trouve les *Staphylococcus* également dans la muqueuse nasale, et commensale de la peau^[124].

B. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie est également des bacilles enrobés à gram négatif^[125], qui se trouve dans le tube digestif de l'homme et des animaux, La majorité des souches sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes pour l'homme^[126].

III.3.2. Matériels et produits utilisés

III.3.2.1. Matériels

- ✓ Disques stériles.
- ✓ Micropipette.
- ✓ Pipette pasteur.
- ✓ Ecouvillon.
- ✓ Pince métallique.
- ✓ Etuve.
- ✓ Boites pétri.
- ✓ Bec benzen

III.3.2.2. Produits

- ✓ Gélose nutritif.
- ✓ Milieux Mueller-Hinton.
- ✓ L'eau physiologique.
- ✓ DMSO.
- ✓ Les extraits : di éthyle éther, acétate d'éthyle, n-butanol, chloroforme,

III.3.3. Repiquage des espèces bactériennes

Dans des conditions stériles, dans un tube à essai prélever une quantité de la souche bactérienne, en milieu culture contient de la Gélose nutritif liquide à l'aide d'une pipette pasteur stérile. On le laisse dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

Après 24 heures, prenez un échantillon de bactéries cultivées et placé dans une boîte de gélose nutritif à l'état solide, et laisser autre fois dans l'étuve pendant 24 heure en 37°C pour faire la culture des nouvelles souches, pour la préparation de l'inoculum.

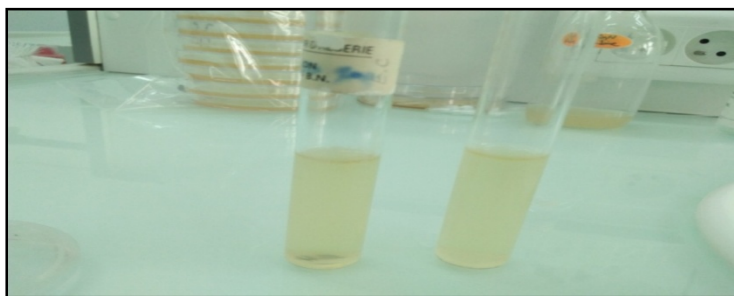


Figure 36 : la culture des bactéries.

III.3.4. Préparation des milieux de culture

Couler le milieu de culture gélosé (Muller Hinton) en sur fusion dans les boîtes de Pétri de façon à obtenir une épaisseur de 3mm pour les boîtes d'un diamètre de 90mm.

Laisser refroidir et solidifier le milieu gélosé en plaçant les boîtes avec les couvercles en place sur une surface fraîche.

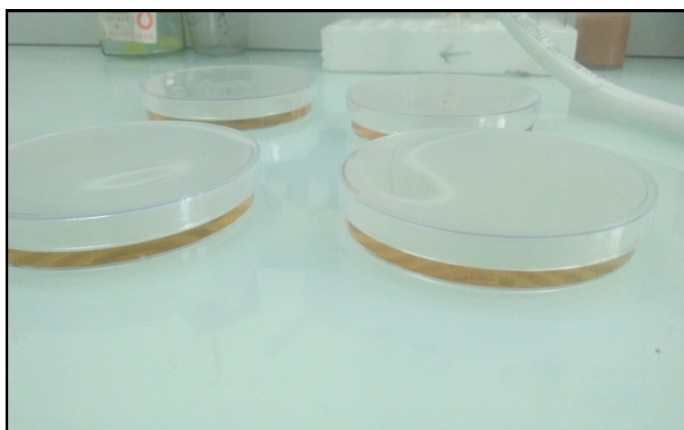


Figure 37 : Préparation des milieux de culture.

III.3.5. Préparation de l'inoculum

Un échantillon des nouvelles bactéries est prélevé et placé dans un volume d'eau physiologique. Puis mesurée la concentration nécessaire pour évaluer l'activité anti bactérienne entre de 0,08 - 0,1 évaluée à une longueur d'onde λ 625 nm.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, il consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, et Ensemencer la boîte afin d'obtenir une culture de colonies confluentes.

III.3.6. Préparation des disques

Des disques de papier filtre d'un diamètre de 6 mm ont été préparés par de papier wathman, stérilisés puis déposés à la surface des boîtes ensemencées.

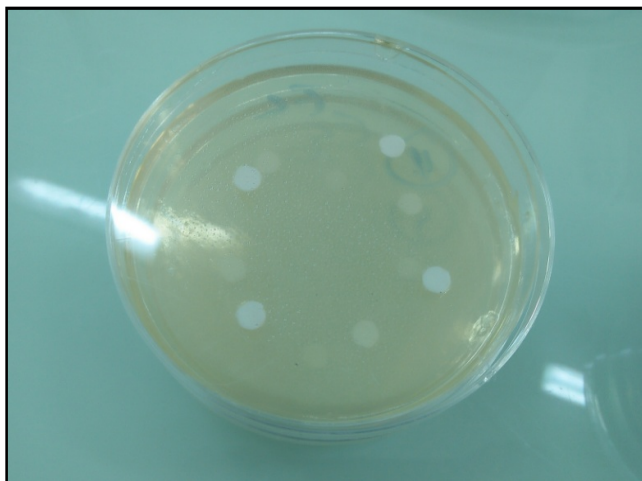


Figure 38 : la disposition des disques.

III.3.7. Dilution des extraits

Cette méthode est basée sur la diminution de la concentration de différents extraits testés par DMSO (1 ml)

Après la dilution chaque extrait sont déposés à la surface des disques par des micropipettes, et Les boites de Pétris sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant quelques temps, et mises à l'étuve (incubée pendant 24h à 37°C).

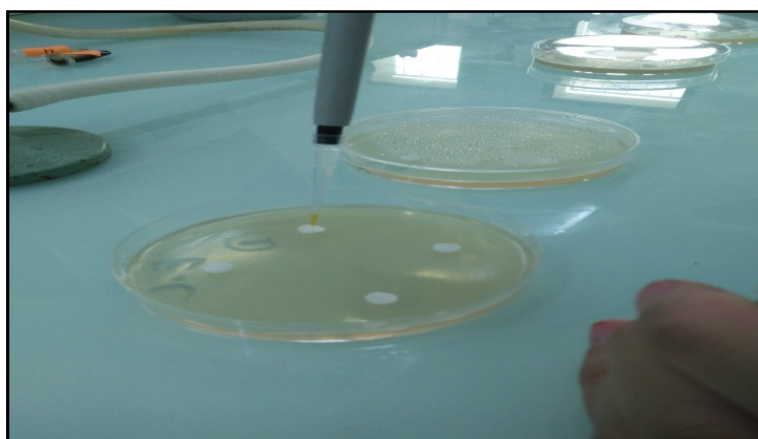


Figure 39 : dépose les extraits sur les disques.

III.3.8. La lecture

L'activité antibactérienne de chaque extrait de la plante testé est évaluée par l'apparition des zones d'inhibition autour les disques.

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV.1. Étude comparative

L'extraction a été faite sur une espèce de *R. sphaerocarpa* avec des quantités respectivement de 20 g et 10 g (partie aérienne). Après macération de trois manières différentes (la partie aérienne dans H₂O (24h) ; EtOH 70% (24h) ; EtOH 100%(3x), extraction, évaporation. Cités dans le chapitre précédent selon le protocole schématisé dans la figure 29.

- Le rendement

Le rendement en extrait est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait et la masse de la matière végétale sèche ^[127]. Il est calculé à l'aide de la formule ci-dessous :

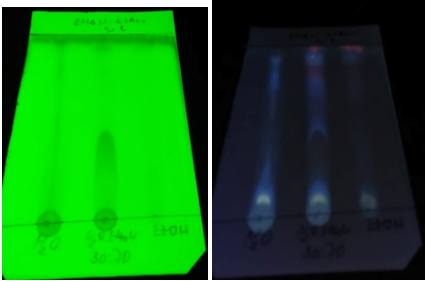
$$R(\%) = (m_{\text{ext}} / m_{\text{mv}}) \times 100 \text{ Où :}$$

R(%) : Rendement de l'extrait en %.

m_{ext}: masse de l'extrait en g.

m_{mv}: masse de la matière végétale en g.

Tableau 7: Présentation des résultats de l'extraction par trois manières de macération.

| Les macéras | La chromatographie sur couche mince | | Le rendement |
|---|--|--------------|--|
| | UV (KW254nm) | UV (LW366nm) | |
| <p><u>H₂O (24h)</u></p> <p>Aspect: liquide fluide, mobile et visqueux légèrement</p> <p>Couleur: Marron clair</p> <p>Odeur : de la plante forte et semi-désagréable</p> |  | | $R(\%) = \frac{0,7}{10} \times 100$ $R(\%) = 7$ |
| <p><u>EtOH 70% /H₂O 30% (24h)</u></p> <p>Aspect : liquide fluide et mobile</p> <p>Couleur : vert foncé</p> <p>Odeur : de la plante se dilue avec l'odeur de l'éthanol</p> | <p><u>UV (Onde K 254nm) :</u></p> <p>Une grande tache apparaît clairement dans le deuxième macéra (EtOH 70%), indiquant la présence de composés qui ne sont pas trouvés dans les deux autres macéras.</p> <p><u>UV (Onde L 366nm) :</u></p> <p>On remarque la fluorescence de plusieurs taches sur la plaque CCM avec des R_f différents dans le domaine visible, ce qui indique que ces produits comportent des liaisons doubles conjugués ou des cycles aromatiques, cette absorption est caractéristique aux composés polyphénoliques. une variété compositionnelle d'où les variétés des colorations des différents spots sur la plaque (violet, bleu, marron). C'est ce qui semble clair, surtout dans le deuxième macéra (EtOH70%).</p> <p>Le premier macéra (H₂O), on observe moins de taches qui correspondent beaucoup plus à des produits polaires.</p> | | |
| <p><u>EtOH 100%(x3)</u></p> <p>Aspect : liquide fluide et mobile</p> <p>Couleur : vert clair</p> <p>Odeur : L'odeur de l'EtOH domine l'odeur de plante</p> | <p>Dans l'extrait ethanologique (EtOH), on remarque des taches qui correspondent aux produits apolaires.</p> | | |

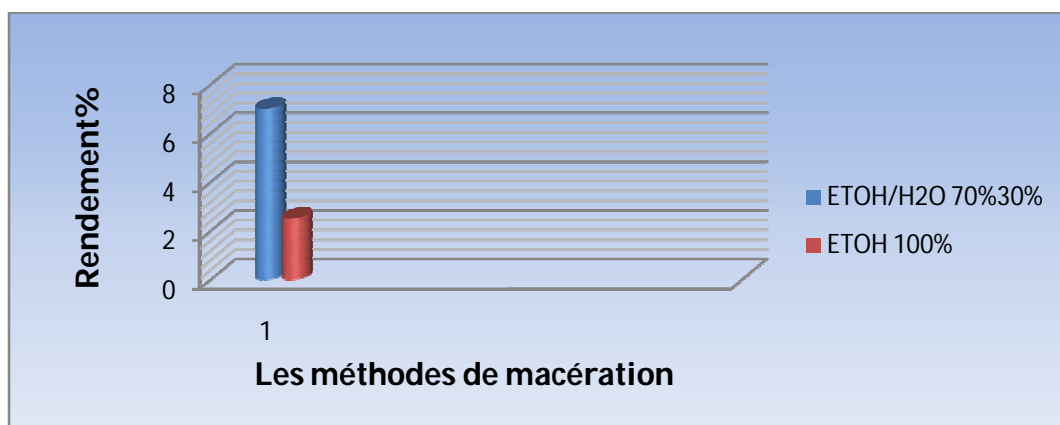


Figure 40: Rendement des extraits de *R. sphaerocarpa* par différent méthodes d'extractions

- Les trois extraits de *R. sphaerocarpa* ont été obtenus à partir de la partie aérienne de cette plante selon trois méthodes d'extraction différentes.
- Sur la base des résultats obtenue, le rendement est de 2.5% pour l'extrait éthanolique (EtOH100%) et de 7% pour l'extrait (EtOH70%) qui peut contenir des flavonoïdes, des polyphénols et d'autres composés. En remarque à partir des chromatogrammes CCM que l'extrait (EtOH70%) contient plus de composés par rapport aux autres extraits selon le nombre des taches colorées tableau 8.

Tableau 8: Les nombres et couleurs des taches de chaque extrait

| Extrait | H ₂ O | EtOH/H ₂ O | EtOH |
|----------------|---|--|---|
| Nbr des taches | 4 | 7 | 3 |
| Couleur | Jaune fluorescent Bleu Bleu Bleu | Jaune fluorescent Bleu Bleu fluorescent Bleu Violette Bleu Rouge | Jaune fluorescent clair Bleu rouge |

Nous concluons, que la méthode d'extraction par la macération éthanolique aqueuse (70%), en termes quantitatif et qualitatif est la meilleure.

IV.2. Criblage phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Afin d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante^[128].

Le screening phytochimique effectuée sur *rérama sphaerocarpa* a permis d'obtenir les Résultats reportés dans le tableau suivant :

Tableau 9: Le screening phytochimique de la plante

| Substances chimiques | | Les réactifs | Résultats | Discussion |
|-----------------------|-------------|--|-----------|--|
| Composées phénoliques | Tanins | Fec13 | + + + | Une réaction moyennement positive. A peut prés; une coloration brun verdâtre et un précipité, donc on a la présence de tanins de type catéchiques ^[129] . |
| | | aluminium chloride | + + + | L'étude sur la couche mince a prouvé très clairement la présence des Flavonoïde |
| Triterpènes/Stéroïdes | Triterpènes | Acide Sulfurique et anhydride acétique | + + + | Une coloration rouge-violet indique la présence de triterpènes |
| | Stérol | | + | une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés |
| | Saponosides | Agitation 15 s Repose 15 minutes | - - - | Aucune apparition de mousse, absence de saponosides |
| Alcaloïdes | | le réactif de Dragendorff | +++ | L'étude sur la couche mince a prouvé très clairement la présence des Alcaloïdes |
| Huiles essentielles | | évaporée à sec | +++ | La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles ^[130] . |

(+): présence, (-): absence, (±): faible, ND: Non Déterminé.

Chapitre IV: Résultats et discussions

Les tests phytochimiques bien que sa la précision soient limitée, ils permettent de détecter la présence ou l'absence de telle ou telle famille chimique.

En générale, les résultats indiquent la présence de divers métabolites secondaires comme des tanins, flavonoïdes, alcaloïdes et stéroïdes dans les divers extraits de plantes.

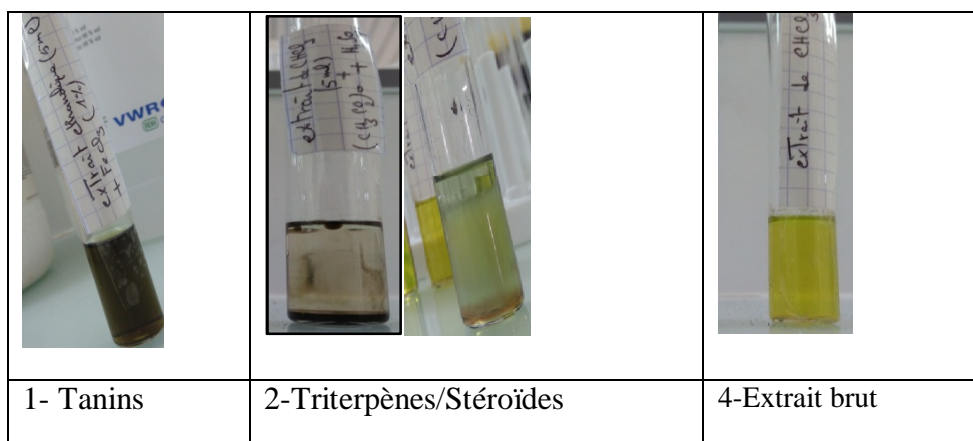


Figure 41: Le screening phytochimique effectue sur *rétama sphaerocarpa*

IV.3.Les tests chromatographiques

IV.3.1. L'extrait éthanol (70%)

IV.3.1.1. Polyphénols et Flavonoïdes

L'extraction liquide –liquide des polyphénols à partir de l'extrait brute éthanolique 70% (350mg) ont étaient faites par l'acétate d'éthyle (71,3mg) puis par le n-Butanol (152mg).

L'étude chromatographique CCM des deux extraits en utilisons le système di éthyle éther/ éther de pétrole (1 :1), nous a informé que l'extrait de l'acétate d'éthyle contient plusieurs taches caractéristique aux polyphénols et flavonoïdes moyennement polaires, par contre dans l'extrait de n-Butanol on observe une tache condensé sur la ligne de départ, qui peut être des flavonoïdes polaires. Fuguer 39



Figure 42: presentation des extraits de flavanoides de l'extrait ethanol 70% sous UV(Onde L 366nm).

Tableau 10 : les résultats de test chromatographique CCM des Polyphénols et Flavonoïdes dans L'extrait éthanol (70%)

| Extrait d'acétate d'éthyle | | | Extraie de n-Butanol | | |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------------|------------|----------------|
| Nbr des taches | Couleur | R _f | Nbr des taches | Couleur | R _f |
| 6 | Bleu fluorescent | 0.1 | 1 | Blue clair | 0 |
| | Violette | 0.34 | | | |
| | Vert | 0.5 | | | |
| | Rouge | 0.62 | | | |
| | Bleu fluorescent | 0.66 | | | |
| | Vert clair | 0.7 | | | |

IV.3.1.2. Alcaloïdes

L'extraction liquide –liquide des alcaloïdes à partir de l'extrait brute ethanolique (70%) (350mg) ont étaient faites par di éthyle éther (76 mg) puis par le chloroforme (164.6 mg).

L'étude chromatographique CCM des deux extraits en utilisons le système di éthyle éther/ éther de pétrole (1 :1), nous a informé que l'extrait de di éthyle éther contient plusieurs taches caractéristique aux alcaloïdes moyennement polaires, par contre dans l'extrait de chloroforme on observe trois taches très clair, ne peut pas déterminer s'il s'agit d'alcaloïdes ou d'autres composés polaires. Comme indiqué dans la fuguer 40.

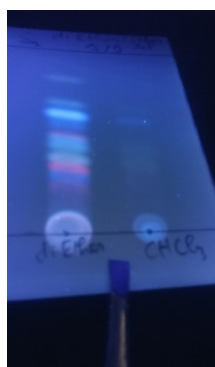


Figure 43 : Presentation des extraits d'alcaloïde de l'extrait ethanol 70% sous UV(Onde L 366nm).

Tableau 11 : les résultats de test chromatographique CCM des alcaloïdes dans L'extrait éthanol (70%)

| Extrait de di éthyle éther | | | Extrait de chloroforme | | |
|----------------------------|-------------------|----------------|------------------------|-------------------|----------------|
| Nbr des taches | Couleur | R _f | Nbr des taches | Couleur | R _f |
| 10 | Jaune fluorescent | 0.1 | 3 | Blanc fluorescent | 0.05 |
| | Rose claire | 0.27 | | Vert clair | 0.31 |
| | Bleu | 0.33 | | Bleu clair | 0.59 |
| | Rouge | 0.38 | | | |
| | Vert fluorescent | 0.43 | | | |
| | Bleu clair | 0.51 | | | |
| | Violette | 0.54 | | | |
| | Blanc fluorescent | 0.67 | | | |
| | Jaune pale | 0.72 | | | |
| | Jaune pale | 0.85 | | | |

IV.3.2. L'extrait éthanolique (100%)

Après l'extraction liquide- liquide par l'ampoule à décanter avec l'utilisation des solvants organiques à l'aide de le rotavapeur pour éliminer le solvant utilisé. On obtient les extraits suivantes pour :

IV.3.2.1. Criblage chromatographique des composés flavonoïdes

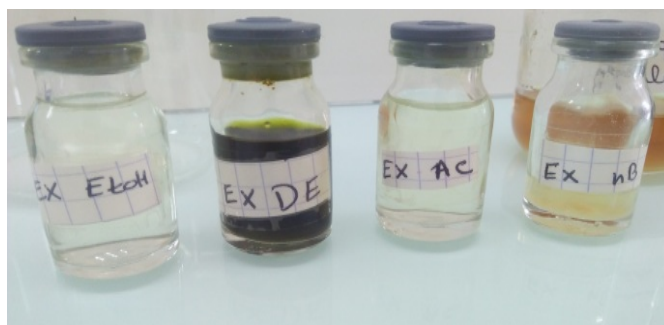


Figure 44 : les extraits obtenus pour l'étude des polyphénols.

- 1- EX DE : extrait di éthyle éther
- 2- EX AC : extrait d'acétate d'éthyle
- 3- EX n-B : extrait de n-butanol
- 4- EX EtOH : extrait brut

- Les deux systèmes ont les même de développement des produit à travers la plaque CCM

a- Système 1 : Di éthyle éther/ éther de pétrole (1/1 V /V)

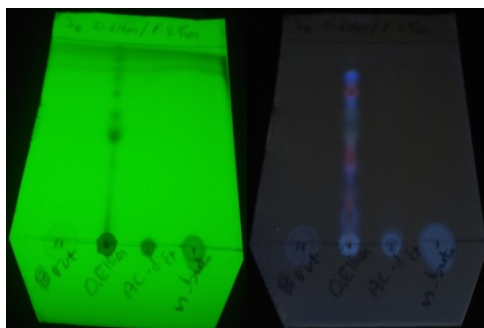


Figure 45 : présentation des extraits des flavonoïdes de l'extrait ethanol 100% avec le système 1 sous UV

b-Système 2 : éther de pétrole / Chloroforme /MeOH /Aciton (4/4/1/1 V/V)

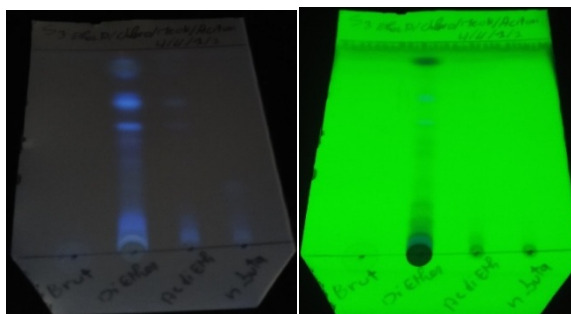


Figure 46 : présentation des extraits des flavonoïdes de l'extrait ethanol (100%) avec le système 2 sous UV

Chapitre IV: Résultats et discussions

Tableau 12 : les résultats des tests chromatographique CCM des flavonoïdes d'extrait éthanol (100%)

| Extrait | Di éthyle éther | Diéthyle acétate | n-Butanol | extrait brut | | | |
|-------------------------|--|---|-----------|--------------|------|------|--|
| Système | Di éthyle éther/ éther de pétrole (1/1 v /v) | éther de pétrole / Chloroforme /MeOH /Acétone (4/4/1/1 v/v) | | | | | |
| Révélateur | AlCl ₃ + UV | | | | | | |
| Nbr des taches | 10 | 3 | 1 | 0 | | | |
| Couleur +R _f | Vert foncé | 0.1 | Blue | 0.1 | Blue | 0.15 | |
| | Rouge | 0.16 | Blue | 0.6 | | | |
| | Violette | 0.3 | Blue | 0.66 | | | |
| | Rouge | 0.36 | | | | | |
| | Vert | 0.46 | | | | | |
| | Vert | 0.6 | | | | | |
| | Blue | 0.66 | | | | | |
| | Marron | 0.7 | | | | | |
| | Violate | 0.8 | | | | | |
| | Blue | 0.9 | | | | | |

Les résultats de la CCM a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) colorées surtout en bleu et orange. Ces colorations confirment la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes.

Les colorations rose, orange et rouge violacé indiquent la présence des flavonols, flavones et flavanones ^{[131][132]}.

IV.3.2.2. Criblage chromatographique des composés alcaloïdes :



Figure 47 : les extraits obtenus pour l'étude des alcaloïdes

- 1- EX DE : extrait di éthyle éther
- 2- CHCl_3 : extrait de chloroforme
- 3- Phase aqueuse alcaloïde : extrait brut

- Selon la littérature nous trouvons que le système de développement efficace est : Di éthyle éther/ éther de pétrole (1/1 V V)

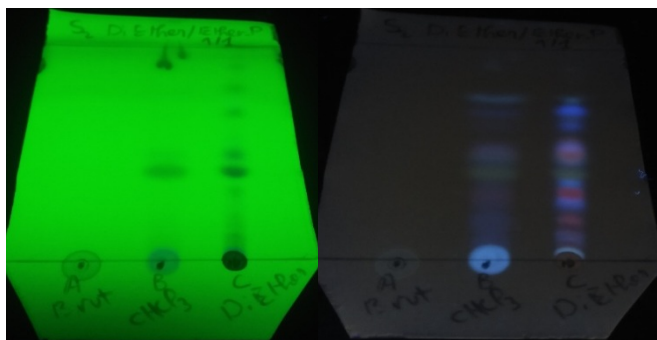


Figure 48 : Système 2 : Di éthyle éther/ éther de pétrole (1/1 V /V)

Tableau 13 : les résultats des tests chromatographique CCM pour les alcaloïdes

| Extrait | Extrait di éthyle éther | | Extrait de chloroforme | |
|-------------------------|-------------------------|------|------------------------|------|
| Révéléateur | Dragendorff+ UV | | | |
| Couleur+ R _f | Blue fluorescent | 0.06 | Rouge | 0.32 |
| | Blue | 0.1 | Vert | 0.4 |
| | Rouge | 0.2 | Violette | 0.5 |
| | Blue | 0.28 | Blue | 0.7 |
| | Rouge | 0.32 | Vert clair | 0.76 |
| | Blue | 0.36 | | |
| | Vert | 0.4 | | |
| | Violate | 0.5 | | |
| | Blue | 0.56 | | |
| | Blue | 0.66 | | |
| | Blue | 0.7 | | |
| | Vert Clair | 0.76 | | |

Les chromatogrammes font apparaître de très nombreuses taches, diversement colorées (voir la figure 45), dans tous les extraits. Qui indique la Présences des déférentes composes. Les spots dans la plaque CCM de l'extrait chloroforme avec une polarité varié confirmé la présence des types d'alcaloïdes déférents ^{[133][21]}.

IV.4. Résultats des tests d'activités antibactériennes

Tableau 14 : Les diamètres des zones d'inhibitions l'activité antibactériennes.

| L'extrait | Acétate di éthyle | | | n-butanol | | | Di éthyle éther | | | chloroforme | | | |
|--|-------------------|----|----|-----------|---|---|-----------------|----|----|-------------|---|---|---|
| | DMSO | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Les disques | | | | | | | | | | | | | |
| Diamètres d'inhibitions d'Escherichia coli | 0 | 11 | 13 | 12 | 0 | 0 | 0 | 16 | 16 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| Diamètres d'inhibitions de Staphylococcus aureus | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 | 8 | 0 | 0 | 0 |

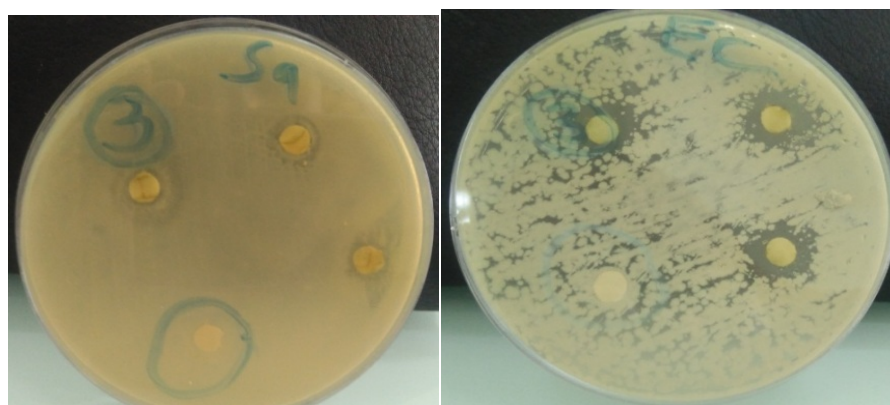


Figure 49: Activité antibactérienne de l'extrait di éthyle éther

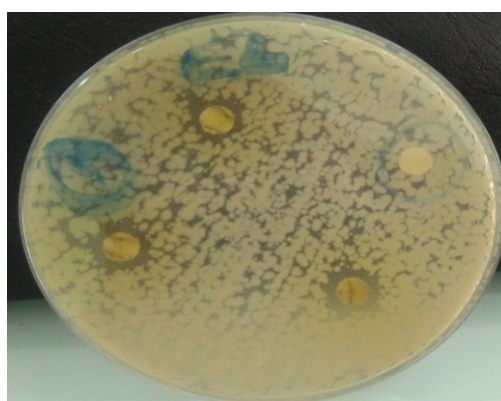


Figure 50 : Activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'éthyle.

Chapitre IV: Résultats et discussions

Nous avons testé l'activité antibactérienne des deux extraits de flavonoïdes et deux d'alcaloïdes vis-à-vis deux souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus*.

Après les mesures d'inhibitions de l'activité antibactériennes avec une seule concentration de tableau14.

On remarque l'absence de l'activité antibactérienne pour l'extrait n-butanol et l'extrait chloroforme. Par contre on trouvée une petite variante d'activité de l'extrait de di éthyle éther qui inhibé surtout la souche *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 16 mm et *Staphylococcus aureus* avec une autre zone de 11mm. Ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle montré une activité modérée avec zone d'inhibition 13mm avec *Escherichia coli*, et n'a pas enregistré aucune résistance avec *Staphylococcus aureus*.

Nous concluons, que les deux extraits n-butanol et le chloroforme possèdent une activité antibactérienne négative.

IV.5. Conclusion générale :

Notre étude est basée sur l'espèce *Rétama sphaerocarpa*, une légumineuse endémique du bassin méditerranéen utilisée pour traiter de nombreuses pathologies, mais il doit être utilisé à des doses limitées, car une consommation irrationnelle peut entraîner des effets secondaires pouvant aller jusqu'à la mort.

Les résultats expérimentaux de différentes méthodes d'extraction montrent que la meilleure méthode pour l'extraction des alcaloïdes, les polyphénols et les flavonoïdes est l'extraction par macération d'éthanol (70%).

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. Ceci confirme l'avantage de cette technique du côté rendement, durée courte et économique et aussi de côté environnemental et la santé, c'est une technique idéale pour extraire des substances naturelles.

En phytothérapie, il faut choisir le solvant en fonction de l'activité biologique recherchée et non celle qui donne une quantité élevée de composés bioactifs.

Les résultats Le screening phytochimique de *Rétama sphaerocarpa* révèlent la présence de divers métabolites secondaires. Cette diversité explique les grandes utilisations en médecine traditionnelle.

Alors que l'étude chromatographique sur la couche de mince a permis de vérifier divers systèmes de développés et de trouver que la meilleure dans cette étude est l'extrait de di éthyle éther /éther de pétrole (1/1 ;2/1). Et les tests par CCM ont montré que les principaux constituants chimiques trouvés dans cette plante étaient des flavonoïdes et des alcaloïdes.

L'étude biologique montre que le pouvoir antibactérien diffère d'un extrait à l'autre, en rapport direct avec les différences de leurs compositions chimiques respectives. Ainsi, la phase d'extraction au di éthyle éther présente une activité inhibitrice plus importante par rapport aux autres phases pour les deux types de bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), en accord avec un rendement d'extraction importante.

Enfin, le résultat total obtenu au cours de cette étude est ouvert des perspectives autour la plante de *retama sphaerocarpa* et pour mener des études pratiques qui serviront de tests complémentaires pour confirmer des activités spéciales pour cette plante pour devenir utilisé dans la fabrication de médecine locale dans l'Algérie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Ma, W.G., Tan, R.X., Fuzzi, N., Li, Q.S., Wolfender, J.L., & Hostettmann, K. (1997). Naturel occurring and synthetic polyne glycoside. *Phytochemistry*, 45(2), 411-415.
- [2] Benzegouta. (2005). Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Thèse de Magister en Pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine. Institut de Chimie, p1.
- [3] Mehnane W. (2010). Appréciation de la diversité génétique du genre *Rétama* par les marqueurs biochimiques. Mémoire De Magister, Université Mentouri de Constantine, 48p.
- [4] Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico, L., & Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context—a tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, 89, 76-84.
- [5] Peirs, C. (2005). Contribution à l'étude phytochimique de *Galega officinalis* L.(Fabaceae) (Doctoral dissertation). Ecole doctora : Science des procédés. (France), pp. 25-27.
- [6] Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E.-A., Stevens P., 2002. Botanique systématique une perspective phylogénétique. 1^{er}édition, paris, 459 p.
- [7] Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American journal of botany*, 91(11), 1846-1862.
- [8] Ndayishimiye, J. (2011). Diversité, endémisme, géographie et conservation des Fabaceae de l'Afrique Centrale. These de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, pp.12-15.
- [9] DJABEUR, K. H. A., Taieb-Brabim-Bokhari, H., Selami, N., Sangare, M., & Mahboubi, S. (2007). Contribution à la connaissance de deux rétames: *Retama monosperma* et *R. reatam*. *Revue des régions arides*, 572-578.
- [10] Quezel, P., Santa, S., 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 475-476-1170.
- [11] Domingo Poveda, F., Moro Cuadrillero, M. J., Sánchez, G., Brenner, A. J., & Gardingen, P. R. V. (1997). Leaf and canopy boundary layer conductances of two semiarid species (*Retama*

Références bibliographiques

sphaerocarpa L. Boiss, and *Stipa tenacissima* L.). Mediterránea. Serie de Estudios Biológicos, Época II, n. 16 (1997); pp. 37-43.

[12] Domingo, F., Sánchez, G., Moro, M. J., Brenner, A. J., & Puigdefábregas, J. (1998). Measurement and modelling of rainfall interception by three semi-arid canopies. *Agricultural and forest meteorology*, 91(3-4), 275-292.

[13] Domingo, F., Villagarcia, L., Brenner, A. J., & Puigdefábregas, J. (1999). Evapotranspiration model for semi-arid shrub-lands tested against data from SE Spain. *Agricultural and Forest Meteorology*, 95(2), 67-84.

[14] Lazaro, M. L., Martín-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F., & González, M. A. (1998). An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* boissier. *Phytochemistry*, 48(2), 401-402.

[15] Allen, O.N., Allen, E.K., 1981. *The leguminosae: a Source book of characteristics, Uses and Nodulation*. Ed Macmillan, London, pp. 577-578.

[16] Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., & Peix, A. (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. Nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and applied microbiology*, 36(4), 218-223.

[17] Hammouche-Mokrane, N., León-González, A. J., Navarro, I., Boulila, F., Benallaoua, S., & Martín-Cordero, C. (2017). Phytochemical Profile and Antibacterial Activity of *Retama raetam* and *R. sphaerocarpa* cladodes from Algeria. *Natural Product Communications*, pp. 1857.

[18] Bahi.K ,1991. Contribution à l'étude de *Rétama monosperma* étude du système racinaire et recherche des associations de type Rhizobium. in In Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma* (boiss) : mémoire de magistère. UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.

[19] El-Shazly, A., Ateya, A. M., Witte, L., & Wink, M. (1996). Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51(5-6), 301-308.

[20] González-Trujano, M. E., Peña, E. I., Martínez, A. L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 476-482.

Références bibliographiques

- [21] Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Editions Tec & Doc Lavoisier.
- [22] Delcambre A. (2010). Une approche moléculaire de l'astringence des vins : utilisation de sondes pour l'étude des interactions entre protéines de la salive et polyphénols. Thèse de doctorat de Chimie analytique et environnement Université de Bordeaux I. Ecole doctorale des sciences chimiques, p. 176.
- [23] Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lapan polyphénols: synthesis, properties, significance. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
- [24] Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., DE LAAGE DE MEUX A., Moulard F., ZHA E., DE LA ROQUE R., DE LA ROQUE O., VICAN P., DEELESALLE -FEAT T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J., Botrel A., 2001. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2^{ème} édition de VUEF, Hong Kong.
- [25] Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 41(5), 1523-1542.
- [26] ROBINET, F.G. (1951). Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich.
- [27] WILLIAM G., HOPKINS M (2003). Physiologie végétale. Traduction de la 2^{ème} édition américaine par Serge Rambour, Bibliothèque Nationale, Paris, 268-273.
- [28] Moghimipour, E., & Handali, S. (2015). Saponin: properties, methods of evaluation and applications. Annual Research & Review in Biology, 207-220.
- [29] Awen BZ, Unnithan CR, Ravi S, Kermagy A, Sasikumar JM, Khrbash AS, Ekreem WL. (2011). Essential oils of *Retama raetam* from Libya: chemical composition and antimicrobial activity. Natural Product Research. 927-33.
- [30] Edziri H, Mastouri M, Chéraif I, Aouni M. (2010). Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. Natural Product Research. 789-796.
- [31] Harborne, J B., Herbert, B. (1995). Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Bristol: Taylor & Francis. 791p

Références bibliographiques

- [32] Wichtl M., Anton R., 2009. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris: 38, 41.
- [33] Doncheva, T., Kostova, N., Yordanova, G., Saadi, H., Akrib, F., Dimitrov, D., & Philipov, S. (2014). Comparison of alkaloid profile from *Glaucium corniculatum* (Papaveraceae) of Algerian and Bulgarian origin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 278-280.
- [34] Marouf A. et Reynaud J., 2007. La botanique de à Z. Dunod, paris, 342 p.
- [35] Dunet, J. (2009). Réaction de Michael et de Mannich appliquées à des arylcyclohexa-2, 5-diènes en vue de la synthèse d'alkaloïdes de type aspidosperma et morphinanes (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- [36] Djahra, A.B. (2015). Cours phytochimie II 2eme Année master. Université Echahid Hamma Lakhdar El-oued. 33p.
- [37] Nacoulma, A. (2013). Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications.
- [38] Muniz, M. N. (2006). Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- [39] Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.
- [40] Seghiri, R. (2005). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea*: *C. africana*, *C. nicaensis*. Mémoire de doctorat en Chimie Organique, Université Mentouri, Constantine.
- [41] Muniz, M. N. (2006). Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- [42] Upadhyay, N. K., Kumar, M. Y., & Gupta, A. (2010). Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3443-3448.
- [43] Bruneton, J. (2001). *Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. 2ème Ed: TEC & DOC.
- [44] RabiaaFdil, Nawal El Hamdani, Abdellatif El Kihel, Khadija Sraidi *Ann Toxicol Anal*. 2012; 24(3): 139-143

Références bibliographiques

- [45] Boussahel, S. (2018). Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif (Doctoral dissertation).
- [46] Marfak A. (2003). Radiolyse Gamma Des Flavonoïdes. Etude De Leur Réactivité Avec Les Radicaux Issus Des Alcools : Formation De Depsides. Thèse de Doctorat. Université De Limoges.199p.
- [47] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
- [48] Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- [49] Dacosta Y. (2003). Les Phytonutriments Bioactifs. Yves Dacosta. Paris, 317p.
- [50] Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- [51] Derbel S. et Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* 1, 28-34.
- [52] Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- [53] Madi A. (2010). Caractérisation Et Comparaison Du Contenu Polyphénolique De deux Plantes Médicinales (Thym Et Sauge) Et La Mise En Evidence De Leurs Activités biologiques. Mémoire De Magister, Université de Constantine.107p
- [54] Bouzergoune F., (2003). Etude phytochimique de la plante *Helianthemum Kahiricum*. Thèse de magister, Université Hadj lahkdar-Batna
- [55] Das, H .C, Wang, J. H. et Lien, E. (1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relationship analysis. *Journal of Food Engineering*, 69, 133-136.
- [56] Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- [57] Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. et kong, S. S. (2004). Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *J Pharmaco .Sci*, 96, 229-254.

Références bibliographiques

- [58] Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., & Folsom, A. R. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149(10), 943-949.
- [59] Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- [60] Louaar, S., Akkal, S., Bousetta, A., Medjroubi, K., Djrri, L., Seguin, E., 2005. Phytochemical study of *Retama sphaeroarpa*. *Chemistry of Natural Compounds* 41, 107-108.
- [61] Louaar, S., Akkal, S., Laouer, H., Guilet, D., 2007. Flavonoides of *Retama sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(5), 616-617.
- [62] Leybros J et Frémeux P (1990).). Opération unitaire, Extraction solide-liquide. *Traité génie des procédés. Extrait de techniques de l'ingénieur*. Ed 2008. J 2780. pp3.
- [63] Delwiche, P. (2008). *Soigner le jardin par les plantes*. Ed. Nature et Progrès Belgique.
- [64] Handa SS. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: Handa SS Singh Khanuja SP, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology. Trieste, Italy, p 1.
- [65] Aiache JM, Beyssac E, Cardot JM, Hoffart V et Renoux R. (2008). *Initiation à la connaissance du médicament*. Ed Masson, Paris. pp116-213
- [66] Ben amor B. (2008). *Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC*. Thèse de doctorat de Génie des Procédés Industriels. Faculté UFR des sciences. Université de la Rochelle pp 3-11.
- [67] DOAT, D. (1974). Article de Application de la chromatographie sur couche mince a l'analyse des gommés et bois tropicaux. P63
- [68] <https://educalingo.com/fr/dic-de/chromatografie>
- [69] Harry W. Lewis & Christopher J. Moody (13 Jun 1989). *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice (Illustrated ed.)*. WileyBlackwell. pp. 159–173. ISBN 978-0-632-02017-1
- [70] Bouhajib, M. (1992). *Analyse des glycosides de Picea Mariana (Mill.) BSP*. Université du Québec à Chicoutimi. P24-27

Références bibliographiques

- [71] Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- [72] Jazy, M. A., Haïdara, M., & Sanogo, R. (2018). Chromatographie sur couche mince et activité antiradicalaire d'extraits de *Pupalia Lappacea* (L.) Juss. *Amaranthaceae*. *European Scientific Journal*, *ESJ*, 14(3), 140.
- [73] Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H. (1995). *Thin-Layer Chromatography*. ISBN 0-89573-876-7 (VCH, New York). P124-127
- [74] Lionel, D. Baptiste, F. (2019). *Physique-Chimie 2de ; La chromatographie sur couche mince (CCM)*. P.335. *hachatteéducation*
- [75] Touchstone, J. C. (1992). *Practice of thin layer chromatography*. John Wiley & Sons.
- [76] Edith, A. Robert, M ; (26 et 28 Janvier 1998) ; *CHROMATOGRAPHIE* p10
- [77] Magniez, F. (2009) ; Article de Chromatographie
- [78] Baaziz. M, (2012). Techniques de séparation et d'analyse des molécules en Biochimie ; Extrait du livre *Sciences de la vie. Biochimie*
- [79] Yongyu, Z., Shujun, S., Jianye, D., Wenyu, W., Huijuan, C., Jianbing, W., & Xiaojun, G. (2011). Quality control method for herbal medicine-chemical fingerprint analysis. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Area*, 171-194.
- [80] Neue, U. D. (1997). *HPLC columns. Theory, Technology, and Practice*.
- [81] Khelfallah. A. (2012). Mémoire de Magister: Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. p85_86
- [82] Anonyme (2010). *HPLC principe et appareillage. Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire ; Copyright © Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen*.
- [83] Striegel, M. F., & Hill, J. (1997). *Thin-layer chromatography for binding media analysis*. Getty Publications. Copy editing Nomi Kleimnuntez.
- [84] H. SAADI, N.NIKOLOV, N.hadjieva .HPLC separation of IRIDOID glycosides from eu plantago species

Références bibliographiques

- [85] Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., & Witier, P. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris
- [86] Bouchonnet, S., & Libong, D. (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. ACTUALITE CHIMIQUE, 7-14.15] TRANCHANT, J. (1996) .article de Chromatographie en phase gazeuse
- [87] Guillaume, G. (2017). Article de La chromatographie en phase gazeuse: principe
- [88] Kamboj, A. (2012). Analytical evaluation of herbal drugs. Drug discovery research in pharmacognosy, 3, 23-55.editing by Omboonvallisuta and Suleiman M, Olimat.
- [89] Bleton, J., Mejanelle, P., Goursaud, S., & Tchaplal, A. (1996). Interet du couplage CPG/SM démontre par la caractérisation de l'acide 4-O-methyl glucuronique dans certaines gommes vegetales. Analisis, 4(24), M14-M16
- [90] Marquet, P., Lachâtre, G., Kintz, P., Pépin, G., Deveaux, M., & Mura, P. (1996). Identification et dosage des principales drogues amphétaminiques clans le sang total par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).
- [91] El-Shazly, A., Ateya, A. M., Witte, L., & Wink, M. (1996). Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. Zeitschrift für Naturforschung C, 51(5-6), 301-308.
- [92] CLEFS CEA - N° 57 - HIVER 2008-2009, document de Les principales techniques d'extraction, de séparation et d'analyse
- [93] FARRÉ, M., MARTÍNEZ, E., & BARCELÓ, D. (2008). Techniques de détermination de composés organiques dans l'environnement
- [94] BELLEBCIR, L. (2007) ; MEMOIR de Magister étude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales.
- [95] Haffar, H. (2014). Electro polymérisation et caractérisation de nouveaux polymères sur substrat transparent (FTO) pour usage dans les cellules photovoltaïques organiques (Doctoral dissertation, Université de m'sila).
- [96]Cambridge, MA, (2021). Jove Science Education Database. Analytical Chemistry. Spectroscopie ultraviolet-Visible (UV-Vis). Jove
- [97] Antoine E. (2012). Article d'Introduction à la spectroscopie UV-Visible.
- [98] Brigitte, D ; Laure, L ;(2019). Article de Spectrophotomètre UV-Visible

Références bibliographiques

- [99] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloïdes/11-determination-de-la-structure/>
- [100] Lejeune, B., Vennat, B., Regeat, F., Gardelle, D., & Foucher, D. (1984). Propolis: extraits et utilisations dans des shampoings et lotions. *Parfums, cosmétiques, arômes*, (56), 65-68.
- [101] Hsu, C. P. S. (1997). Infrared spectroscopy. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, 247, 277.
- [102] Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.
- [103] Dominique, G. Christian, L. (2004) *Introduction à la spectroscopie Infrarouge (I.R.)*
- [104] Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (Eds.).(2008). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. John Wiley & Sons.
- [105] Dahoo, P. R., & Lakhlifi, A. (2021). *Spectroscopie infrarouge de toupies symétriques et sphériques pour l'observation spatiale 1 (Vol. 3)*. ISTE Group.
- [106] Grenier, B. (2017). *Spectroscopie théorique: description des effets de la température sur les paramètres de résonance magnétique nucléaire (Doctoral dissertation, Aix-Marseille)*.
- [107] MERATATE, F. (2013). *Etude phytochimique et pouvoir biologique des métabolites secondaires de la plante *Zizyphora hispanica L.* de la région de M'SILA (Doctoral dissertation, Université de m'sila)*.
- [108] Dominique, G. (2002). *Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)*.
- [109] Mansour, A. (2009). *Investigation phytochimique de l'extrait n-Butanol de l'espèce *Centaurea africana**.
- [110] Larguet, H. *Les Molécules terpéniques (ecdystéroïdes) des fleurs de *serratula cichoracea**
- [111] Goyer, P. *La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)*.
- [112] Lafont, R. (2005). *Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules*.
- [113] Bohlmann, F., & Zeisberg, R. (1975). Lupinen-Alkaloide, XLI. ¹³C-NMR-Spektren von Lupinen-Alkaloiden. *Chemische Berichte*, 108(4), 1043-1051
- [114] Neuner-Jehle, N., Schumann, D., & Spittler, G. (1967). Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden, 6.Mitt. Hydroxy-derivate des Sparteins. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 98(3), 836-851.

Références bibliographiques

- [115] Neuner-Jehle, N., Nesvadba, H., & Spitteller, G. (1965). Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt. Pyrrolizidin alkaloides aus dem Goldregen. Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften, 96(2), 321-338.
- [116] Menet, M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. Revue francophone des laboratoires, 2011(437), 41-53.
- [117] Baboux, N. (2001). Analyse ultime par Spectrométrie de Masses des Ions Secondaires des matériaux de la microélectronique avancée: contribution à l'interprétation des profils de bore dans le silicium (Doctoral dissertation, Lyon, INSA).
- [118] Stéphane, B. O. U. C. H. O. N. N. E. T. (2009). La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Lavoisier
- [119] Mr Magniez, (2010). La spectrométrie de masse
- [120] Claude Menet, M, (2011). Principes de la spectrométrie de masse
- [121] HART, T., & SHEARS, P. (2002). Atlas de poche de Microbiologie Flammarion Médecine Sciences. Paris, p213.
- [122] Flandrois, J. P. (Ed.). (1997). Bactériologie médicale. Presses universitaires de Lyon. .
- [123] Plata, K., Rosato, A. E., & Wegrzyn, G. (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica, 56(4).
- [124] Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. Eur Cell Mater, 4(3), 100-20.
- [125] Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Microbiologie, 2. 123-140.
- [126] Anonyme. (2003). Bactériologie. Université de Pierre et Marie Curie. 122p
- [127] Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). Nature & Technology, (9), 35

Références bibliographiques

- [128] Boufellous, M., Lrhorfi, L. A., Berrani, A., Haoud, H. E., Zaher, A., Bouhaddioui, B., & Bengueddour, R. (2017). Phytochemical screening of a medicinal plant: *Lavandula stoechas* (Lamiaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 56-62.
- [129] Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M., & Dehhaoui, M. (2005). Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, 15(4), 220-229.
- [130] Aggoun, L. (2018). Activité antibactérienne et inhibitrice de β -lactamases des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa L* (Doctoral dissertation).
- [131] Bouquet A., Fouret A. (1975) Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du Congo-Brazzaville. *FITOTERAPIA*. 46(4)
- [132] N'guessan K., Kadja B., Zirihi G N., Traoré D and Aké -Assi L. (2009) screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays krobou (agboville, côte-d'ivoire). *Sciences & nature*. Vol 6N°1: 1-15.
- [133] SUSPLUGAS, V. MASSA, P. SUSPLUGAS, R. TAILLADE, Mme. C. SUSPLUGAS et J. SALABERT (1975). Fumeterres en languedoc roussillon. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 32 (2) : 233-239.
- [134] Golebiewski, W. M., & Spenser, I. D. (1988). Biosynthesis of the lupine alkaloids. II. Sparteine and lupanine. *Canadian Journal of Chemistry*, 66(7), 1734-1748.
- [135] O'Neill, B. T., Yohannes, D., Bundesmann, M. W., & Arnold, E. P. (2000). Total synthesis of (\pm)-cytisine. *Organic letters*, 2(26), 4201-4204.
- [136] Han, R., Takahashi, H., Nakamura, M., Yoshimoto, N., Suzuki, H., Shibata, D., & Saito, K. (2015). Transcriptomic landscape of *Pueraria lobata* demonstrates potential for phytochemical study. *Frontiers in plant science*, 6, 426.