

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



Université de Ghardaïa
Faculté des Sciences et Technologies
Département Sciences et Technologies

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme master

spécialité : Génie chimique

Par :

HADJ KOUIDER ABD ELGHANI

BEN HADID NACIRA

THEME :

*CONTRIBUTION A LA PURIFICATION ET LA CARACTERISATION CHIMIQUE
DE QUELQUES PRINCIPES ACTIFS DE L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE D'
COTULA CINEREA DE LA REGION DE GHARDAÏA*

Devant le jury :

Kaifouche	Maitre assistant A Univ Ghardaïa	président
Adamou youcef	Maitre assistant A Univ Ghardaïa	Examineur
Baba arbi ilias	Maitre assistant A Univ Ghardaïa	Examineur
Hellali naima	Maitre assistant A Univ Ghardaïa	Encadreur

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2017/2018

Remerciements

Au terme de ce modeste travail nous tentons à remercier notre DIEU qui nous a donné puissance et patience afin de réaliser ce travail. Nous tentons également à remercier nos Chères Parents pour leurs soutient.

Nous témoignons nos sincères reconnaissances à M^{LL} :HELALI NAIMA d'avoir acceptées d'être encadré et nous suivre dans notre travail avec intérêt enthousiasme et qui étaient toujours présentes avec ses précieux conseils, remarques et encouragements dans les moments difficiles.

Nous nous remercions à toute personne, qui par un simple geste, un simple mot, a pu me orientés ou n aider dans notre recherche.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mes **Parents**

A mes **Frères**

À mes **Amis**

ABD Elghani

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mes **Parents**

A mon **Marie**

À mes **Enfants**

Nacira

المخلص :

Cotula cinerea المعروفة باسم القرطوفة هي نبتة طبية من عائلة Asterales من اكثر النباتات استعمالا في الطب التقليدي . تم التحصل على اربع مستخلصات عضوية عن طريق الاستخلاص بالنقع وقد تم استعمال الايثربترول واسيتات الايثيل وثنائي الكلوروفورم والآن بوتانول كان مردودها بالترتيب كالاتي : 2,13 ; 3,34% ; 1,14%. مكونات المستخلصات تم فصلها عن طريق CCM. تم تقييم المساهمة في التنقية بواسطة CCM وقد توصلنا الى ان (polyamide) CCM هو افضل طريقة مقارنة بالطرق الاخرى .

Résumé :

Cotula cinerea, connue sous le nom vernaculaire «Gartoufa» est une plante médicinale de la famille des Astérales, largement utilisée en médecine traditionnelle.

L'extrait méthanolique brut a été obtenu par l'extraction par macération (EM),

les rendements des fractions obtenus (etherpétrolique, l'acétate d'éthyle, dichloroforme et n-butanol) sont : 2,13%, 3,34% et 1,14%. Les composés des fractions isolés ont été séparés par CCM.

L'évaluation de la contribution de purification qui a été réalisée en utilisant la méthode du CCM et on résultant que CCM(polyamide) c'est la meilleure méthode entre les autres.

	Page
Introduction générale	01
Chapitre I	
I.1. Généralité sur les plantes médicinales :	03
I.2. Composition chimique de la plante :	03
I.3. les principes actifs :	03
I.3.1. Métabolites primaires :	03
I.3.2. Les métabolites secondaires :	04
I.3.2.1. Les composés phénoliques:	05
I.3.2.1.1. Les Flavonoïdes :	05
I.3.2.1.2. Les tannins :	06
I.3.2.1.2.1. Les tannins hydrolysables :	07
I.3.2.1.2.2. Les tannins condensés :	08
I.3.2.1.3. Les coumarines :	08
I.3.2.1.4. Les quinones :	09
I.3.2.1.5. Les alcaloïdes :	10
I.3.2.1.6. Les Terpénoïdes :	10
I.3.2.1.7. Les stéroïdes :	10
I.4. Présentation du matériel végétal étudié:	11
I.4.1. Description botanique :	12
I.4.2. Place dans la systématique :	12
I.4.3. Répartition géographique :	12
I.4.4. La composition chimique :	12
I.4.5. Utilisation de la plante :	12

Chapitre II:	13
II.1.Extraction :	14
II.1.3.1.Enfleurage	14
II.1.3.Types d'extraction :	14
II.1.2. Intérêt de l'extraction :	14
II.1.3.2. Extraction par solvant :	15
II.1.3.2.1. Types d'extraction par solvant :	15
II.1.3.2.1.1. Extraction directe :	15
II.1.3.2.1.2. Extraction liquide-liquide :	15
II.1.3.2.1.2.1. Types d'extraction liquide-liquide :	15
II.1.3.2.1.3. Extraction solide-liquide :	15
II.1.3.2.2.Extraction par hydro-distillation :	15
II.2.techniques de séparation :	18
II.2.1. la purification :	19
II.2.1.1. quelques Moyens et techniques de purification :	19
II.2.1.1.1. Filtration :	19
II.2.1.1.2.La centrifugation :	19
II.2.1.1.3.La chromatographie :	20
II.2.1.1.3.1.Types de chromatographie :	20
II.2.1.1.4. Evaporateur rotatif :	21
Chapitre III:	22
III -1- Matériel végétal :	23
III-1-1- Echantillonnage :	23

SOMMAIRE

III.1.2. Séchage et conservation :	23
III-2- Extraction :	23
III-2-1- Extraction par macération :	23
III-2-2- Extraction et fractionnement des principes actifs :	24
III-3- L'analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince :	27
III-3-1- Mode opératoire :	27
Chapitre IV :	28
IV.1. Fractionnement et analyse chromatographique par la CCM:	29
IV.1.1. Fractionnement :	29
IV.1.2. Le rendement de l'extraction :	29
IV.1.3. Chromatographie analytique sur couche mince :	30
Conclusion :	38
Références :	39
Annexes :	45

SOMMAIRE

Abréviation

CCM : chromatographie sur couche mince

Rf : Rapport frontal

RAS : rien a signalé

IS : insuffisant

	Titre	page
Figure 01	Structure de base d'un flavonoïde	05
Figure02	l'hétérocycle C	06
Figure03	Exemple d'un tanin hydrolysable	07
Figure04	Exemple d'un tanin condensé	08
Figure05	Structure d'une molécule de coumarine	09
Figure06	: structure de base de quinone	09
Figure07	Structure de des Terpénoïdes	10
Figure08	Stéroïde R = diverses chaînes latérales	11
Figure09	<i>Cotula cinerea. Del</i>	11
Figure10	Les différents types d'ampoule à décanter	16
Figure11	Schéma d'une hydro-distillation.	17
Figure12	La situation géographique de la région de récolte	23
Figure13	Extraction par macération	24
Figure14	une extraction liquide/liquide déchlorométhane	24
Figure15	une extraction liquide/liquide de l'éther de pétrole	25
Figure16	rotavapor type(Heidolph)	25
Figure17	<i>le protocole d'extraction de différentes extraites</i>	26

Liste des tableaux

	titre	pages
Tableau 01	tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.	30
Tableau 02	Fluorescence des composés flavoniques	30
Tableau 03	Les résultats de la CCM (gel de silice).	31
Tableau 04	Les résultats de la CCM (gel de silice).	33 ;34
Tableau 05	Les résultats de la CCM (polyamide).	35
Tableau 06	Les résultats de la CCM (Bidirectionnelle).	36

Introduction

Générale

Introduction

Introduction :

Depuis toujours les plantes médicinales ont constitué la source majeure du médicament, grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animale et végétale.

Parmi les milliers de molécules organiques produites par ce métabolisme, (polyphénols, terpènes, alcaloïdes, stéroïdes, coumarines,...), l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus, ...) et de corriger ses troubles métaboliques.

Les composés polyphénoliques, terpéniques ont fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques, ce qui a permis l'identification des milliers de structures dans le règne végétal, et en exploitant l'évolution très rapide des techniques d'analyse chimique, en particulier, la chromatographie simple ou couplée aux diverses techniques spectroscopiques. La séparation et la caractérisation structurales de ces substances est devenue de plus en plus aisée.

Parmi les polyphénols, les flavonoïdes, constituent les métabolites secondaires les plus largement distribués dans le monde végétal, leur diversité structurale et leur bonne stabilité leur ont conféré des propriétés chimiques et biologiques très importantes.

La majorité du territoire national (le Sahara algérien), est citée parmi les zones arides du monde où les conditions climatiques sont très dures pour que des plantes sauvages puissent survivre, mais ces dernières en s'adaptant, elles synthétisent des substances actives qui ne sont pas vitales, mais elles sont d'un grand intérêt pour elles. Ces substances en plus de leur intérêt dans l'organisme de ces plantes, elles rendent ces dernières, plus intéressantes du point de vue composition chimique.

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles des zones arides et plus particulièrement dans la région de Ghardaïa (oued metlili) notamment en terme de plantes médicinales utilisées traditionnellement, nous nous sommes proposés d'élucider la composition chimique de la plante *Cotula cinerea* et de caractériser quelques principes actifs.

Ce travail se répartit comme suit :

- 1/ Echantillonnage et extraction macération méthanol-eau
- 2/dégradation de polarité par extraction liquide-liquide
- 3/ Analyse des extraits par sur couche mince .

Chapitre

I

I.1. Généralité sur les plantes médicinales :

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales [1].

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents [2].

I.2. Composition chimique de la plante :

On y trouve des flavonoïdes isolées chez *Cotula cinerea* sont : flavone O- et C-glycosides, flavonols glycosides et quercetagine 3, 6, 7-triméthyl éther, lactones sesquitérpeniques, les glaucolides [3] et les coumarines sesquitérpeniques . [4]

I.3. les principes actifs :

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments. [5] Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines .[6]

Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...). [7]

Ces composés sont des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes.

I.3.1. Métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme. Ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal, se retrouvent dans toutes les espèces. [8]

- **Les glucides** représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois (cellulose).
- **Les lipides** constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.

- **Les amino acides** représentent une source primaire de construction des protéines. [9]

Les glucides sont des constituants universels des organismes vivants. Parfois appelés hydrates de carbone, ce sont, en première approximation, des composés organiques carbonylés (aldéhydiques ou cétoniques) polyhydroxylés. On englobe dans le groupe des glucides leurs dérivés d'oxydation ou de réduction (acides uroniques, polyols), leurs esters et leurs éthers, leurs dérivés aminés (osamines). [10]

Selon les végétaux, on rencontre les glucides

- Comme réserves énergétiques, sous forme de polymères (par exemple l'amidon) qui stockent l'énergie solaire captée par le processus photosynthétique.

- Comme constituants de métabolites variés : acides nucléiques et coenzymes, mais aussi hétérosides multiples dont le rôle n'est que rarement connu.

Comme précurseurs obligés de tous les autres métabolites : formés en premier au cours de la photosynthèse à partir du dioxyde de carbone et de l'eau, ils sont à la base de tous les composés organiques du monde vivant. [11]

I.3.2. Les métabolites secondaires :

La vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. À côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme en particulier illustrés dans le domaine thérapeutique [12]. Ces composés sont synthétisés dans les différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles...). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles sont métabolisées, ces substances sont extrêmement complexes du point de vue structure et composition chimique. On trouve ces métabolites dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles et cette distribution varie d'une plante à l'autre [13].

Toutefois, leur métabolisme produit des milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique [14]. Il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères.

Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections virales...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement la dose dépendant de la structure [15]. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, ils sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, [15,16]. Les composés

phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les alcaloïdes .chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine, [17,15].

I.3.2.1.Les composés phénoliques:

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas des fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction [18].

Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances avec plus de 8000 structures phénoliques. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate [19].

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant [20].

I.3.2.1.1.Les Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques, ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres [21] En 2003, environ de 4000 composés flavoniques sont connus [22] .Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux, ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à- dire liée à des oses et autres substances [23].

On a une squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (Cycle C) (figure 02) [24].

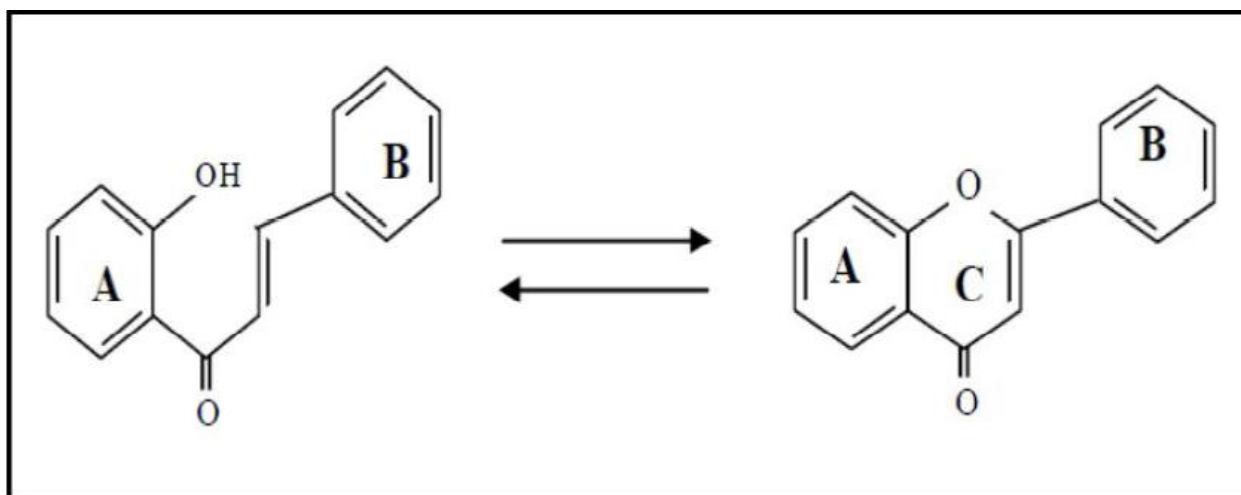


Figure 01: Structure de base d'un flavonoïde [24].

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo [25] . Ils se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont représentées dans (**Figure 02**).

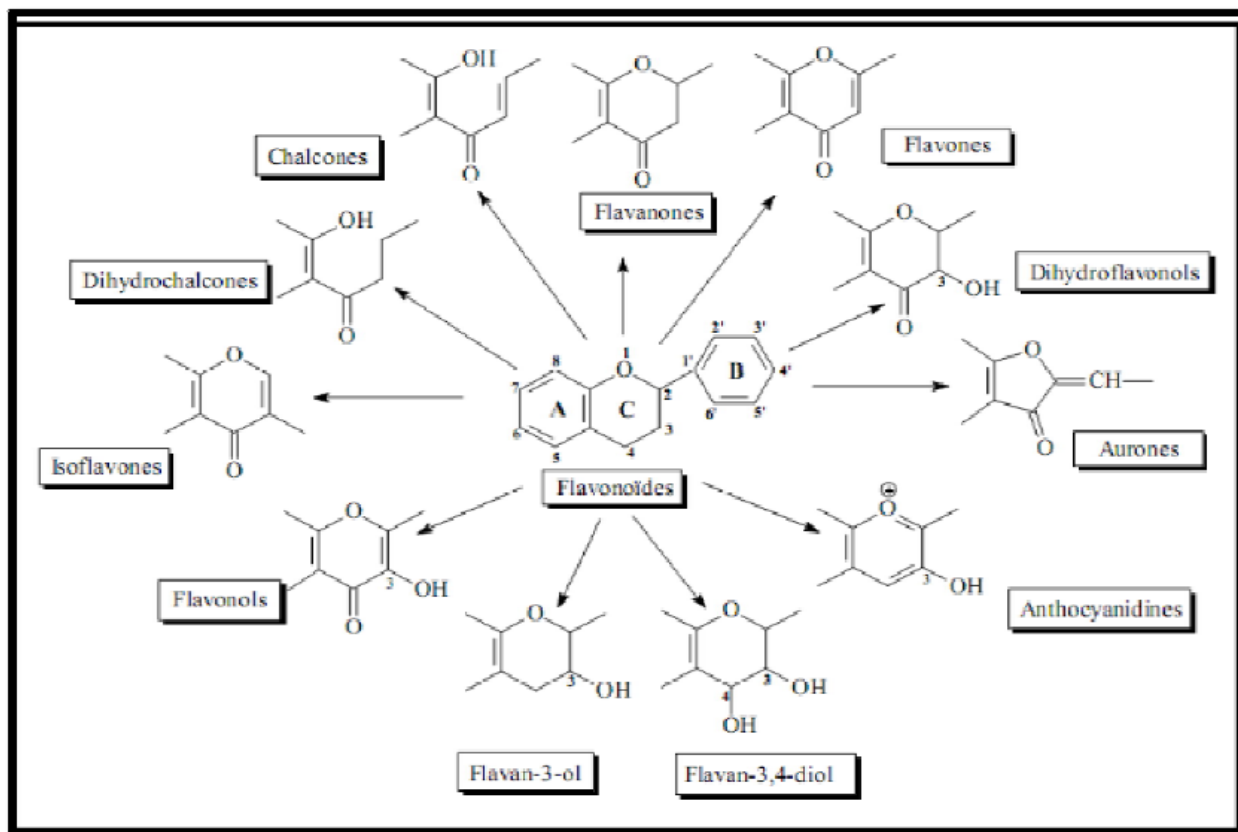


Figure 2 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C [26].

I.3.2.1.2. Les tannins :

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités [27]. Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) [28]. Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité

organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) [29]. Les tannins sont utilisés :

- ✓ **En pharmacie** Grâce à leur astringence les tannins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes [30].
- ✓ **Dans l'industrie** Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures [30].

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

-Les tannins hydrolysables :

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

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

Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres). L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C6-C3, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur [31].

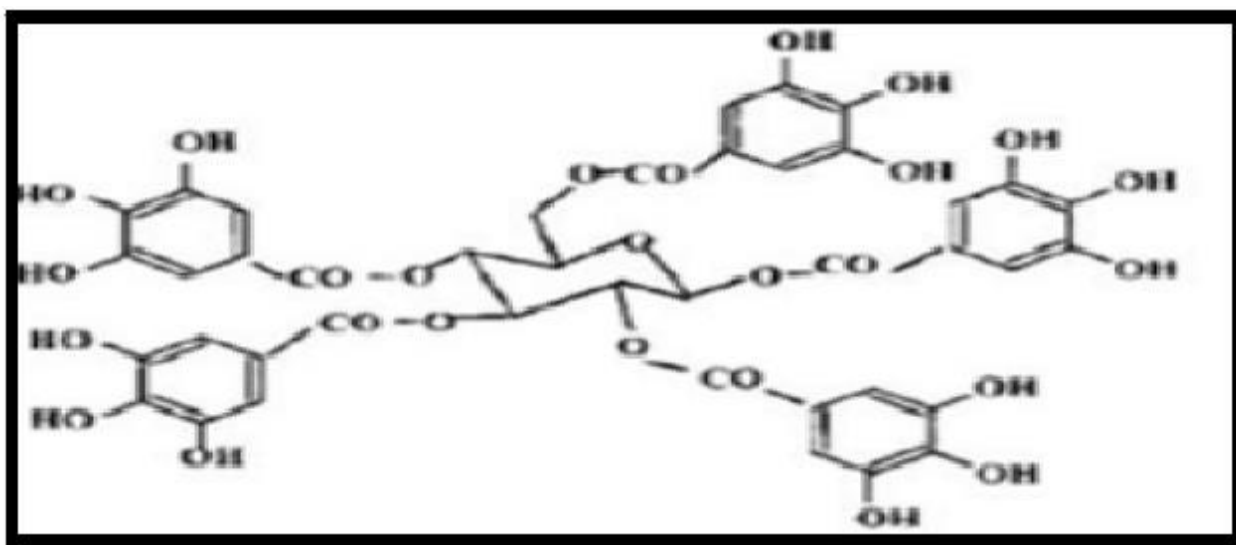


Figure 03: Exemple d'un tannin hydrolysable [32].

-Les tannins condensés :

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols . Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine [33]. En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines [34].

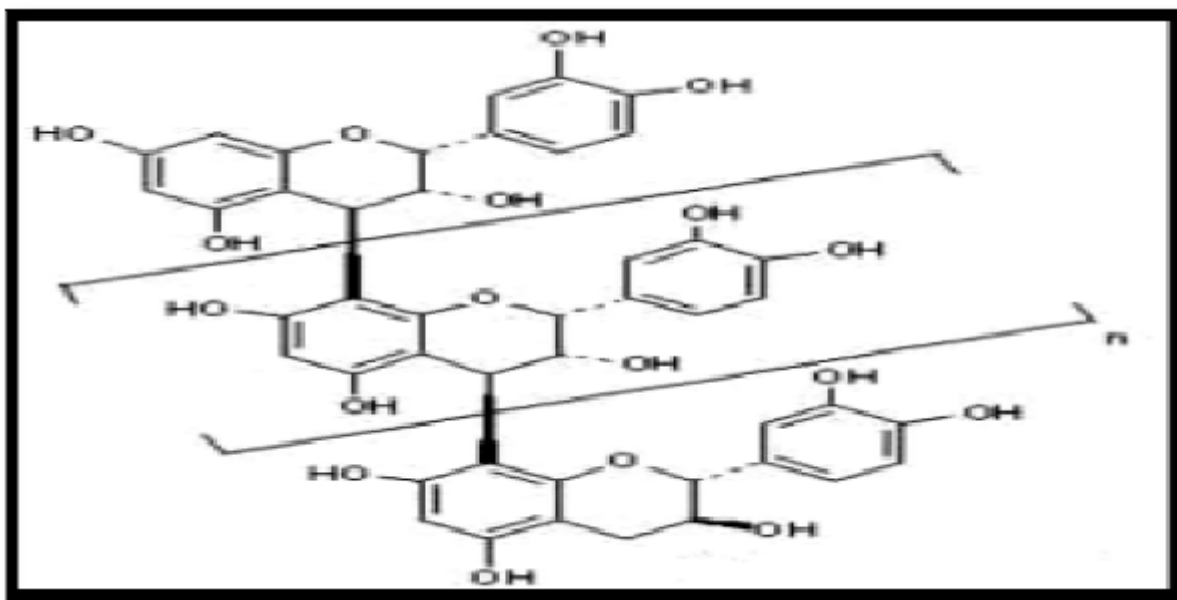


Figure 04 : Exemple d'un tanin condensé [35]

I.3.2.1.3. Les coumarines :

Les coumarines (Figure 06) sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2- hydroxy-7-cinnamiques [36]. Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau [17].

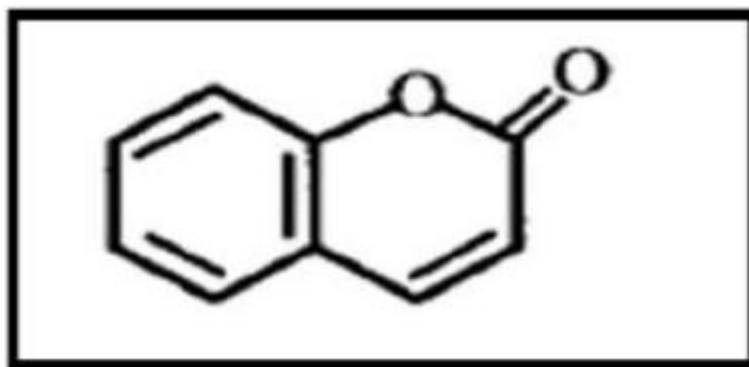


Figure 05 : Structure d'une molécule de coumarine [37].

La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto-biologiques [38], bactériostatiques et antifongiques [39].

I.3.2.1.4. Les quinones :

Ils sont appelés aussi benzoquinone ($C_6H_4O_2$), c'est l'un des deux isomères de lacyclohexadienedione. L'orthobenzoquinone est la 1,2-dione, alors que la parabenzoquinone, est la 1,4-dione (**figure06**).

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides. des fonctions biologiques essentielles chez les être vivants, en particulier le transfert des électrons dans les mitochondries et les chloroplastes [40].



1,4- benzoquinon

1,2- benzoquinon

Figure 06: structure de base de quinone[40]

I.3.2.1.5. Les alcaloïdes :

Le terme alcaloïde a été introduit par W. Meisner en 1818 et est utilisé pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, ce sont des substances azotées, basiques, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique [17]. Cet atome d'azote provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Cependant, il existe un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur, dans ce cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones [41].

I.3.2.1.6. Les Terpénoïdes :

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes (**Figure8**) [42]

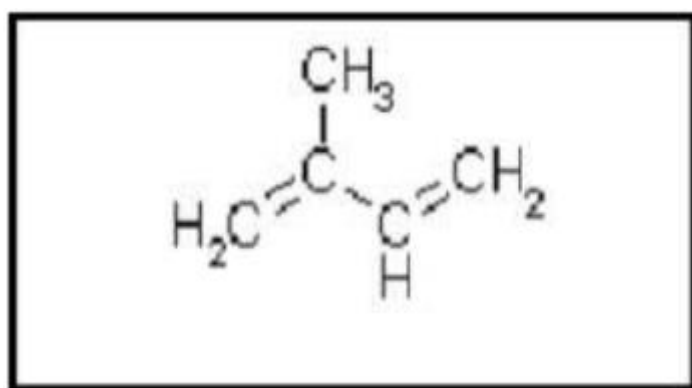


Figure07 : Structure de des Terpénoïdes[43]

I.3.2.1.7. Les stéroïdes :

Les stéroïdes représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol ou de ses homologues particulièrement abondants dans les végétaux et les animaux. Cette classe de substances naturelles présente une sous-classe de triterpènes dont la structure chimique, de base et un système tetracyclique. Les quatre cycles sont désignés par les lettres A, B, C, D en débutant par le cycle en bas à gauche [44] comme il est présenté dans la **figure 08**.

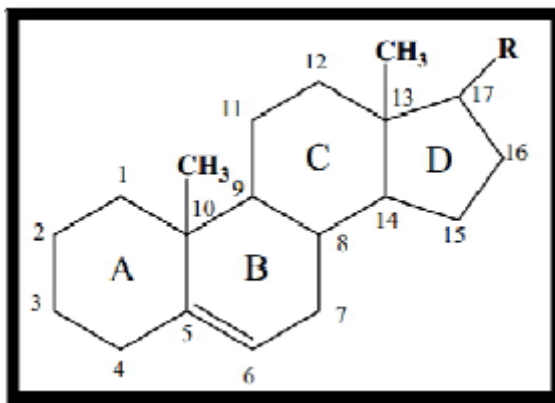


Figure 08 : Stéroïde R = diverses chaînes latérales [45]

I.4. Présentation du matériel végétal étudié:

La plante *Cotula cinerea* (syn : *Brocchia cinerea*) appartient à l'une des plus vastes familles du règne végétal, les Composées (Compositae = Asteraceae).

Elle comprend plus de 1000 genres et 15000 espèces, répartis sur tous les continents et dans les milieux les plus divers [46].

Les plantes de cette famille sont parmi les végétaux supérieurs, la plupart d'entre elles renferment une potentialité thérapeutique, voir même économique, très précieuse à titre d'exemple : *Artemisia*, *Camomille*, *Tournesol* [47].

Les populations des régions arides et semi arides ont apprécié et valorisé cette richesse naturelle et l'ont explorée en tant que remède à leurs maladies et pour d'autres fins pratiques de leurs vie courante.

Cotula cinerea (figure 1) est citée plante médicinale spontanée [48], très connue par les populations des régions sahariennes, entre autre la région de Ghardaia, pour ses applications thérapeutiques et alimentaires (pour animaux).



Figure 09 : *Cotula cinerea*. Del [49]

I.4.1. Description botanique :

L'espèce est à feuilles laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leurs parties supérieures en trois à cinq dents obtus. Tiges de 10 à 40 cm, couchées puis redressées, capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux à fleurs ; toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaunes d'or lorsqu'elles s'ouvrent. Très connue dans tout le Sahara, notamment dans les sols un peu sablonneux [50].

I.4.2. Place dans la systématique :

Embranchement : Spermaphytes.

S/ embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Ordre : Astérales.

Famille: Composées.

Genre : Cotula.

Espèce : C.cinerea Del. [51]

I.4.3. Répartition géographique :

L'espèce Cotula cinerea est très rencontrée dans tout le Sahara, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés. Dans la région de Ghardaïa, elle est retrouvée à Oued metlili. [49] Cotula cinerea est aussi connue dans les régions sahariennes d'Égypte [52, 53] et du Maroc [54-55]...

I.4.4. La composition chimique :

L'espèce Cotula cinerea est très riche en sesquiterpènes lactones, sesquiterpènes coumarines et en flavonoïdes [54-55].

Parmi les flavonoïdes isolés à partir de cette plante on peut citer: Kaempféritine, Quercétine, Quercitrine, Kaempférol, Lutéoline, Lutéoline 6-OH-7-O- β -D glucoside, Apigénine 7-O- α -L-rhamnoside, Quercitine 3-O- β -glucoside et 5, 3', 4'-trihydroxy -3,6,7-triméthoxy flavone....[49, 50] Cette espèce en tant que plante aromatique, son huile essentielle renferme plusieurs composés terpéniques parmi lesquels nous citons, Camphre, α, β - Thujone, camphène, α, β - Pinène, 1,8- Cineole, Bornyl acetate [56].

I.4.5. Utilisation de la plante :

Les populations de la région de Ghardaïa et ses environs utilisent Cotula cinerea pour plusieurs raisons thérapeutiques :

- Elle est utilisée contre la colique, la diarrhée, la toux et aussi pour des applications broncho-pulmonaires.

- Par ailleurs, elle est utilisée pour aromatiser les soupes durant le mois de ramadhan . Elle sert aussi comme nourriture pour leurs animaux.
- Commercialises dans les souks .
- Elle est classé dans les plantes médicinales.
- Parmi les autres activités biologiques attribuées à cette plante, citées dans la littérature, nous trouvons, l'activité anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, anti-bactérienne, fébrifuge et l'activité larvicide des extraits du n-butanol, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et du chloroforme [54,55, 57, 58].

Chapitre

II

II.1.Extraction :

L'extraction consiste à transférer un composé d'une phase à une autre:

- D'une phase liquide à une autre phase liquide.
- D'une phase solide à une phase liquide.

C'est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques. [59,60]

II.1.2. Intérêt de l'extraction :

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament. [61]

II.1.3.Types d'extraction :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne. [62]

II.1.3.1.Enfleurage

Il consiste à extraire naturellement le parfum des fleurs grâce à l'absorption effectuée par les corps gras. Il existe deux types d'enfleurage: à chaud et à froid selon la résistance de la plante à la chaleur. Cette méthode est particulièrement employée lorsque l'hydrodistillation dénature les molécules à extraire.

- ✓ Enfleurage à chaud (macération): consiste à faire infuser les fleurs ou autres éléments odorants dans des matières grasses, huiles ou graisses, préalablement chauffées. Les mélanges obtenus sont ensuite filtrés à travers des tissus afin d'obtenir des onguents parfumés.

- ✓ Enfleurage à froid: Les fleurs les plus fragiles qui ne supportent pas la chaleur sont disposées sur des châssis de verre enduit de graisse et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces. Lorsque le parfumeur considère que la graisse est saturée, elle est grattée et mélangée à un peu d'alcool pour obtenir des pommades ou bien épuisée par de l'alcool. Le principe est assez simple:

Les molécules odorantes étant des composés volatils, au lieu de les laisser s'échapper dans l'air, elles sont captées par la graisse qui a la propriété de les dissoudre. Lors de l'ajout de l'alcool les molécules organiques passent dans ce solvant.

II.1.3.2. Extraction par solvant :

Elle consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant. Celui-ci peut être de l'eau, mais généralement il s'agira d'un solvant organique: éthanol, cyclohexane, éther de pétrole, toluène, etc. Dans l'extraction par solvant, les plantes sont mélangées à un solvant. Les composés à extraire étant emprisonnés dans la cellule par la membrane cellulaire, il faudra donc des solvants capables de la traverser. En plus, il arrive que des traces de solvant soient présentes dans les molécules à extraire ou bien dans la matière végétale après traitement. [60]

II.1.3.2.1. Types d'extraction par solvant :

II.1.3.2.1.1. Extraction directe :

L'espèce chimique est extraite d'un produit naturel par macération puis filtration (par exemple l'extraction des arômes des zestes d'orange). [61]

II.1.3.2.1.2. Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide est l'une des techniques de préparation d'échantillons les plus anciennes. C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles.

L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

L'extraction liquide-liquide est la succession de plusieurs étapes. La première étape est la mise en contact des deux phases. Pour augmenter la surface d'échange, la phase à extraire et la phase d'extraction sont mélangées. La seconde étape consiste à obtenir l'équilibre du système (saturation de la phase d'extraction) qui est régi par les lois de la diffusion et de la solubilité (coefficient de partage). La dernière étape est la séparation des phases (décantation). [61]

II.1.3.2.1.2.1. Types d'extraction liquide-liquide :

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide.

A) Extraction liquide-liquide discontinue :

Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter. Il existe plusieurs modèles d'ampoules à décanter. Celles ayant la tubulure au dessus du robinet sont les plus utilisées, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc de mieux séparer les deux phases. [62,59]

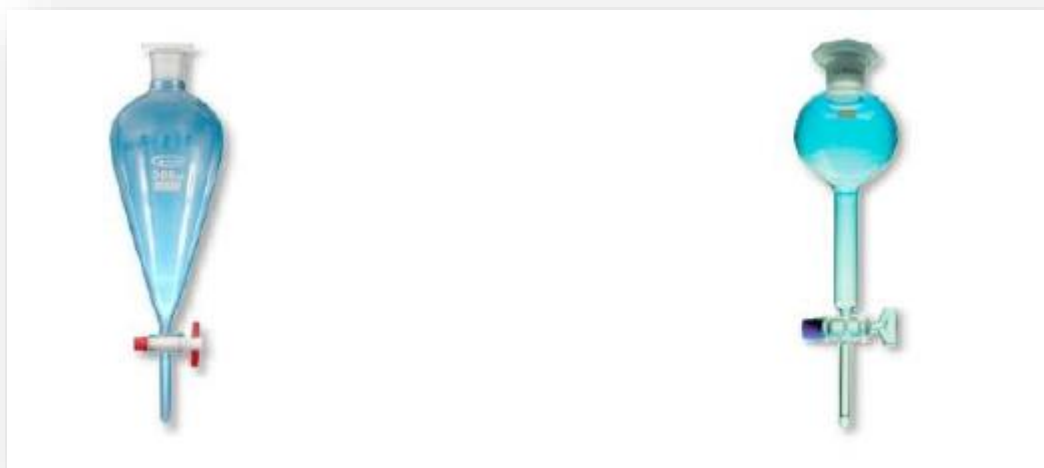


Figure 10. Les différents types d'ampoule à décanter.

B) Extraction liquide-liquide continue :

Lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire.

II.1.3.2.1.3. Extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide.

Pratiquement, il est impossible de dissoudre un seul composé, d'autres constituants de la phase solide ont été entraînés avec lui, quelque soit le solvant utilisé. En laboratoire de chimie organique, on utilise parfois des appareils plus efficaces, les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa, qui fonctionnent en continu . [62]

II.1.3.2.2. Extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau) :

L'hydro-distillation consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. C'est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles (**Fig. 5**). Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résisteront pas au chauffage.

La vapeur d'eau produite va entraîner avec elle un composé donné selon un phénomène physique particulier: la création d'un azéotrope (mélange de deux liquides qui bout à température fixe et ne se distille pas en bouillant). Il s'agit en fait d'un mélange de composés, non miscibles, (l'eau et

une molécule odorante). La vapeur d'eau chargée en molécules organiques est condensée puis récupérée. Le liquide obtenu est appelé distillat. Il y a donc séparation de deux phases: l'une aqueuse et l'autre organique, cette dernière contenant le composé à extraire. Pour récupérer l'huile essentielle, il faut procéder à une extraction liquide-liquide. [60,62]

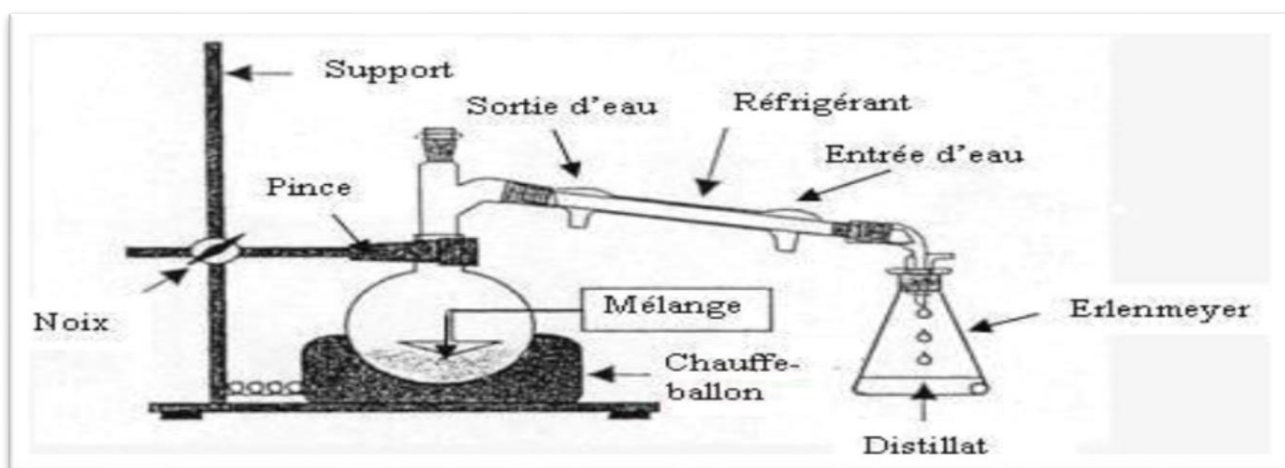


Figure 11. Schéma d'une hydro-distillation.

L'hydro-distillation fait intervenir les étapes suivantes:

- ✓ L'entraînement à la vapeur: Consiste à bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Par la suite, ces vapeurs sont condensées à l'aide d'un réfrigérant.
- ✓ Le relargage: Consiste à rendre les huiles essentielles, qui sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau, moins solubles par l'ajout du chlorure de sodium. De cette manière, il sera plus facile de récupérer ces huiles essentielles.
- ✓ La décantation: Est réalisée dans une ampoule à décanter, dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles.

Une phase aqueuse, plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles.

- ✓ Le séchage et la filtration: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, il est important de faire agir un déshydratant (C'est le séchage). Pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau il faut réaliser une filtration. [62]

II.2.techniques de séparation :

Les techniques de séparations sont nombreuses et diversifiées. Elles sont pratiquement appliquées à tous les niveaux en génie chimie et conditionnent le développement de l'industrie moderne.

En vue de faciliter la compréhension des principes de bases de ces opérations unitaires indispensables, nous avons proposés ce manuel pratique comme complément du cours pour permettre aux étudiants en génie des procédés de se familiariser avec ces techniques fondamentales et découvrir les champs de leurs applications. [63]

L'extraction est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, sur la base de propriétés chimiques ou physiques.

L'homme utilise des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité, par différentes techniques:

- **La filtration:** Depuis les temps préhistoriques, l'homme utilise un lit de sable ou de mousse pour rendre une eau boueuse (pleine de boue) limpide (claire et transparente).
- **Le pressage:** Consiste à exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus, ou à écraser des fleurs pour extraire les arômes.
- **L'enfleurage:** Est une forme d'extraction utilisée en parfumerie. Il repose sur le pouvoir d'absorption d'une huile essentielle par les corps gras. Par exemple, les fleurs fragiles sont posées sur des cadres enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact; en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes.
- **La décoction:** Cette méthode est très ancienne. Elle consiste à chauffer la racine ou l'écorce d'une plante avec de l'eau; jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante et les constituants se dissolvent.
- **L'infusion:** Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes (les feuilles ou les fleurs) finement broyées puis les laisser tremper pour dissoudre leurs principes actifs.
- **La macération:** Consiste à laisser séjourner à froid un solide dans un liquide pour en extraire les constituants solubles dans ce liquide.
- **L'extraction par solvant:** C'est un procédé qui permet d'extraire des composés qui ne peuvent pas l'être avec de l'eau.
- **L'entraînement à la vapeur ou l'hydrodistillation:** Cette technique date de l'Egypte ancienne. Elle consiste à extraire les parfums des plantes (huiles parfumées ou huiles essentielles) par de la vapeur d'eau.

Nous ne pourrions appliquer que les méthodes d'extraction par hydrodistillation ou bien par solvants, l'enflourage étant trop long et coûteux en matière première (pour un litre d'absolu de jasmin, il faut compter un tonne de fleurs). [60,59]

II.2.1. la purification :

En chimie, la purification est la séparation de substances chimiques dans le but de décontaminer des substances. [60]

II.2.1.1. quelques Moyens et techniques de purification :

Il existe plusieurs moyens de purification :

- ✓ La filtration.
- ✓ La centrifugation.
- ✓ La chromatographie.
- ✓ Recristallisation
- ✓ Distillation fractionnée
- ✓ Evaporateur rotatif

II.2.1.1.1. Filtration :

La filtration est une méthode mécanique utilisée pour séparer un solide d'un liquide ou d'un gaz en faisant passer le mélange par une membrane ou un chiffon fin, par l'aide d'un entonnoir.

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie ou par de nombreuses espèces animales, principalement aquatique. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu (aussi communément appelé "gâteau" ou rétentat).

La microfiltration est une séparation de particules de l'ordre de micromètre.

La filtration stérilisante est un cas particulier, les particules étant des microorganismes.

Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir:

- ✓ Un liquide clarifié, débarrassé des particules solides.
- ✓ Un solide essoré de l'excès de liquide. [64, 60]

II.2.1.1.2. La centrifugation :

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité

(culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

L'ultracentrifugation utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques. [64]

II.2.1.1.3.La chromatographie :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. [65]

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire. [65,60]

II.2.1.1.3.1.Types de chromatographie :

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie en phase liquide (CPL):
- Chromatographie sur couche mince (CCM).
- Chromatographie de partage centrifuge (CPC).

- Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), à séparer ou à purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC). [65]

Chapitre III:

Les méthodes d'extraction de ces principes actifs varient, selon la classe flavonique recherchée, et font appel à une variété de solvants organiques. Les plus employés sont les alcools additionnés d'eau à des pourcentages variables selon que la drogue est fraîche ou sèche [56]. Ces mélanges hydro-alcooliques peuvent être utilisés à l'état frais ou chaud, ils sont surtout recommandés pour l'extraction, il est possible de procéder ensuite à des extractions liquide-liquide par des solvants organiques non miscibles à l'eau.

III -1- Matériel végétal :

III-1-1- Echantillonnage :

La plante a été récoltée durant la période Octobre 2018 à la commune de Metlili de la région de Ghardaïa (Algérie). La plante a été déposée au laboratoire de Chimie I (à l'Université de Ghardaïa).



Figure12 : La situation géographique de la région de récolte .

III.1.2. Séchage et conservation :

Le séchage a été effectué dans un endroit sec et à l'ombre dans un endroit aéré presque de 10 jours en moyenne, puis le matériel végétal a été conservé dans une bouteille de verre.

III-2- Extraction :

III-2-1- Extraction par macération (le mélange eau- méthanol 30/70 (v/v)) :

La matière végétale sèche, est macérée pendant 48 heures à température ambiante. après filtration, le filtrat est La macération consiste à émerger 200 g de plante de *Cotula cinerea* avec un mélange méthanol/eau (70/30) (v/v) pendant 48 heures à température ambiante, Ensuite la filtration est réalisée sur papier filtre et le solvant a été récupéré du filtrat.



Figure13 : Extraction par macération (le mélange eau- méthanol 30/70 (v/v))

III-2-2- Extraction et fractionnement des principes actifs :

Nous procédés ensuite a une extraction liquide/liquide successivement l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et dichlorométhane et n-butanol .



Figure14 : une extraction liquide/liquide dichlorométhane



Figure 15 : une extraction liquide/liquide de l'éther de pétrole

Les extraits organiques sont évaporés dans un rotavapor type (Heidolph) chaque phase à sa température, les extraits obtenus ont été conservés au 4°C jusqu'à l'utilisation.



Figure 16 : rotavapor type (Heidolph)

Le rendement des extraits a été calculé par la formule suivante:

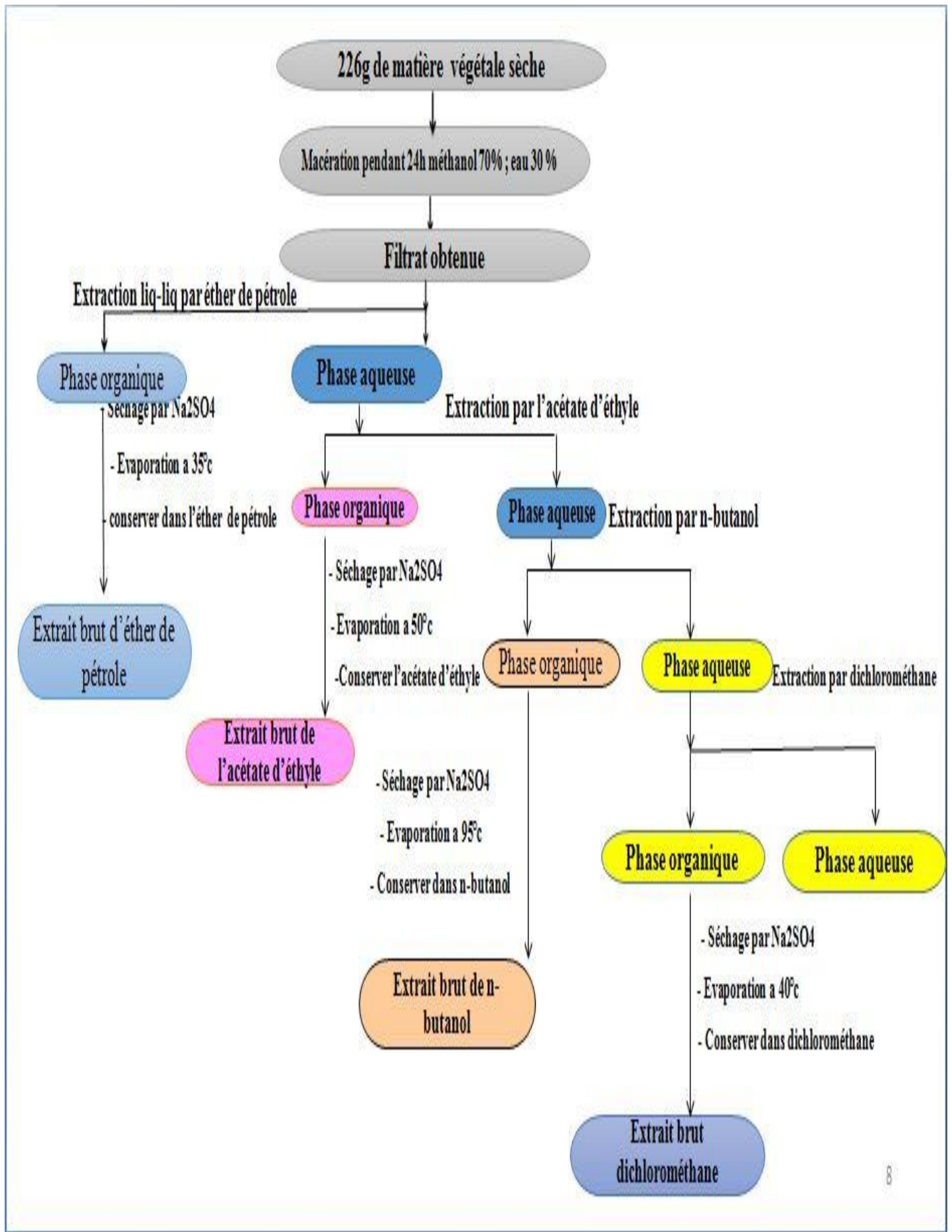
$$R (\%) = 100 \text{ Mext}/\text{Mpv.}$$

Où :

R: est le rendement en %;

Mext: est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g;

Mpv: est la masse sèche la plante en g.



III-3- L'analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince est une méthode analytique utilisée pour la séparation, identification des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire, en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage [67]. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, cette méthode a été utilisée pour l'identification des différents phyto composés pour l'extrait brut et des fractions: étherpétrolique chloroformique et de hexane pour la plante étudiée. Les plaques de chromatographie utilisées ce sont des plaque sen gel de silice de type **Silica gel 60F 254** de 0,25 mm d'épaisseur.

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques (acétate d'éthyle +hexane) (90/10)(v/v).

Chaque substance qui migre est caractérisée par son Rapport frontal (**Rf**) :

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

d: Distance parcourue par le constituant.

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

III-3-1- Mode opératoire :

La chromatographie sur couche mince (CCM) effectuées sur les extraits :

Ether pétrolique , l'acétate d'éthyle , dichlorométhane et de n-butanol dans les systèmes d'élution suivants :

- hexane -Acétate d'éthyle:(90%,10%) , chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entrainé par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Après le séchage de plaque montre dans vapeur d'I2. Les constitutions sont colorés.

Chapitre III:

Dans cette partie de notre travail nous avons effectué des séparations par la technique de la chromatographie sur couche mince (CCM) :

a/ Gel de silice (**Silica gel 60F 254**)

b/ Poly amide (**Silice gel 60 NH₂**)

c/ Bidirectionnelle

Cet technique est considérée comme très pratique vu l'économie de solvants et d'échantillons réalisés en même temps que l'obtention de plusieurs informations sur la constitution d'un échantillon une fois les conditions opératoires optimisées.

Nous notons également que les dimensions des feuilles de polyamide sont les suivantes: 10 cm de longueur et 5 cm de largeur et laisser 1 cm au-dessus et en dessous.

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

IV.1.1. Fractionnement :

Un extrait brut de *cotula cinérea* à été obtenu par la macération des parties aériennes dans un mélange méthanol / eau (70/30 : v/v). le fractionnement a été réalisés par le protocole les différents solvants utilisés nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

- Phase de Ether de pétrole : obtenue après l'extraction liq-liq par l'éther de pétrole.
- Phase de l'acétate d'éthyle : obtenue après l'extraction liq-liq par l'acétate d'éthyle.
- Phase de Déchlorométhane : obtenue après l'extraction liq-liq par Déchlorométhane.
- Phase de n-butanol : obtenue après l'extraction liq-liq par n-butanol .

IV.1.2. Le rendement de l'extraction :

Le rendement d'extraction ont été déterminés par la formule suivants :

$$R\% = 100[M_{ext}/M_{pv}]$$

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

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

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentes dans **le tableau** suivant :

Matériel végétal	Extrait	M(g)	Rendements(%)
<i>cotula cinérea</i>	Ether de pétrole	4.27	2.13
	l'acétate d'ethyle	6.68	3.34
	Dichlorométhane	2.99	1.14
	n-butanol	73.13	36.56

Tableau 01 : tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.

Nous constatons que l'extrait l'acétate d'ethyle de *cotula cinérea* enregistre un fort rendement de l'ordre de 3.34% suivi par l'extrait d' Ether de pétrole à raison 2.13% et l'extraction liquide liquide par déchlorométhane donnée un 1.14% suivi par l'extrait de n-butanol à raison 36.56% . Le dernier résultat est déraisonnable en raison de la teneur élevée en **n-butanol** (c'est-à-dire que l'échantillon contient une quantité d'eau)

IV.1.3. Chromatographie analytique sur couche mince :

Pour avoir compositions chimiques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs, un chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant un solvant moyennement polaires. Les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des quelques composées chimiques.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de tous nos extraits sont résumés dans les tableaux .

Les chromatogrammes obtenus par la CCM des extraits Ether de pétrole, l'acétate d'ethyle, dichlorométhane et n-butanol de *cotula cinérea* montrent une richesse en constituants chimiques.

Couleur	Jaune(j)	Marron(mr)	Mauve(mv)	Bleue(b)	Verte(v)	Sombre(s)
groupements de composés	Flavonols Aurones (même dans le visible)	Flavones Flavonol-3-glycosylés	isoflavones	Methoxy flavonols	Flavonols sans (OH) à la position (5)	Isoflavones Flavones

Tableau 02 : Fluorescence des composés flavoniques (sans réactifs) [66].

		Ether de pétrole		l'acétate d'éthyle		dichlorométhane		n-butanol	
Acétated'éthyle / Héxane	100%	R _{f1} :0,12 R _{f1} :0,26	Jaune Jaune	R _{f1} :0,1 R _{f2} :0,26	Jaune Mauve	IS	IS	-	-
	90%- 10%	R _{f1} :0,12 R _{f2} :0,18 R _{f3} :0,28 R _{f4} :0,35 R _{f5} :0,43 R _{f6} :0,52 R _{f7} :0,6 R _{f8} :0,81 R _{f9} :0,96	Jaune Jaune Jaune Mauve Mauve Mauve Jaune Jaune	R _{f1} :0,16 R _{f2} :0,25 R _{f3} :0,55 R _{f4} :0,66 R _{f5} :0,65 R _{f6} :0,81 R _{f7} :0,96	Jaune Mauve Jaune Mauve Jaune Jaune Jaune	IS	IS	-	-
	80%- 20%	R _{f1} :0,25 R _{f2} :0,35 R _{f3} :0,47 R _{f4} :0,6 R _{f5} :0,88	Mauve Jaune Mauve Jaune Jaune	R _{f1} :0,31 R _{f2} :0,46 R _{f3} :0,6 R _{f4} :0,88	Jaune Mauve Mauve Jaune	IS	IS	R _{f1} :0,18	Mauve
	70%- 30%	R _{f1} :0,31 R _{f2} :0,45 R _{f3} :0,8	Jaune Mauve Jaune	R _{f1} :0,22 R _{f2} :0,47 R _{f1} :0,6	Jaune Mauve Jaune	R _{f2} :0,25 R _{f2} :0,47	Mauve Jaune	-	-
	60%- 40%	R _{f1} :0,5 R _{f2} :0,81	Mauve Jaune	R _{f1} :0,37 R _{f2} :0,5 R _{f3} :0,81	Jaune Mauve Jaune	IS	IS	-	-
	50%- 50%	R _{f1} :0,77 R _{f2} :0,91 R _{f3} :0,97	Jaune Mauve Jaune	R _{f1} :0,75 R _{f1} :0,91	Mauve Jaune	IS	IS	-	-

Tableau 03 : Les résultats de la CCM (gel de silice).

Les résultats de la CCM effectuées pour les extraits dans le système solvant Acétate d'éthyle / Héxane (90% - 10%) : bon séparation dans les deux fractions ; Ether de pétrole , l'acétate d'éthyle .

		Ether de pétrole		l'acétate d'éthyle		dichlorométhane		n- butanol	brute	
Dichlorométhane / Méthanol	96%	R _{f1} :0,86	Jaune	R _{f1} :0,11	Jaune	R _{f1} :0,07	Jaune	-	R _{f1} :0,27	orange
	:	R _{f2} :0,95	Mauve	R _{f2} :0,16	Mauve	R _{f2} :0,4	orange		R _{f2} :0,95	Mauve
	4%	R _{f3} :1	orange	R _{f3} :0,17	orange	R _{f3} :0,97	Jaune			
				R _{f4} :0,21	orange	R _{f4} :0,96	Mauve			
				R _{f5} :0,26	Mauve					
				R _{f6} :0,35	Jaune					
				R _{f7} :0,37	orange					
				R _{f8} :0,87	Mauve					
				R _{f9} :1	orange					
n-butanol / l'acétate d'éthyle / H ₂ O	65 :	R _{f1} :0,77	Mauve	R _{f1} :0,32	Mauve	R _{f1} :0,11	Mauve		R _{f1} :0,37	orange
	15 :	R _{f2} :0,87	Mauve	R _{f2} :0,75	orange	R _{f2} :0,37	Jaune		R _{f2} :0,85	Mauve
	25	R _{f3} :0,97	Jaune	R _{f3} :0,9	orange	R _{f3} :0,75	Mauve			
Dichlorométhane / Acétate acétique	2 :1	R A S	R A S	R A S	R A S	R A S	R A S	R A S	R A S	R A S
	:1									

Chloroforme /Méthanol /Acétate	90 : 5: 5	R _{f1} :0,68 R _{f2} :0,98	Jaune Mauve	R _{f1} :0,13 R _{f2} :0,16 R _{f3} :0,25 R _{f4} :0,32 R _{f5} :0,38 R _{f6} :0,42 R _{f7} :0,87 R _{f8} :0,87	Jaune orange Mauve orange orange Mauve Orange	R _{f1} :0,08 R _{f2} :0,16 R _{f3} :0,32 R _{f4} :0,5 R _{f3} :0,75 R _{f4} :0,93	Jaune Mauve Orange Jaune Jaune Mauve		R _{f1} :0,32 R _{f3} :0,87	orange Mauve
Acétate d' ethyle / Héxane	1 : 1	R _{f1} :0,65 R _{f2} :0,73 R _{f3} :0,92 R _{f4} :0,97	Jaune Jaune Mauve orange	R _{f1} :0,26 R _{f2} :0,55 R _{f3} :0,65 R _{f4} :0,87 R _{f5} :0,97	Orange Mauve Jaune Orange Mauve	R _{f1} :0,11 R _{f2} :0,33 R _{f3} :0,98	Jaune Jaune Mauve		R _{f1} :0,87	Mauve
Chloroforme/Méthanol	92 : 8	R _{f1} :0,7 R _{f2} :0,87	Jaune Mauve	R _{f1} :0,13 R _{f1} :0,21 R _{f3} :0,42 R _{f4} :0,97	Jaune Orange Mauve Mauve	R _{f1} :0,15 R _{f2} :0,3 R _{f3} :0,41 R _{f4} :0,5 R _{f5} :0,75	Mauve Jaune Mauve Jaune Mauve		R _{f1} :0,92	Mauve

Tableau 04 : Les résultats de la CCM (gel de silice).

Les résultats de la CCM (gel de silice) effectuées pour les extraits dans le système solvant Déchlorométhane / Méthanol (96% : 4%) ; Chloroforme /Méthanol /Acétate (90% : 5% : 5%) bon séparation dans la fraction d'acétate d'éthyle .

		Ether de pétrole		l'acétate d'éthyle		déchlorométhane		n- butanol	brute	
Toluène / Méthanol	100 %	R _{f1} :0,38 R _{f2} :0,58 R _{f3} :0,9	Orang e Mauve Jaune	R _{f1} :0,43 R _{f2} :0,58 R _{f3} :0,75 R _{f4} :0,88	orange Mauve Jaune Jaune	R _{f1} :0,62	Mauve	-	R _{f1} :0,41	Mauve
	90 %	R _{f1} :0,95	Mauve	R _{f1} :0,38 R _{f2} :0,43 R _{f3} :0,46 R _{f4} :0,9 R _{f5} :1	Orange Mauve orange Jaune orange	R _{f1} :0,32 R _{f2} :0,95 R _{f3} :0,75	orange Jaune	-	R _{f1} :0,26 R _{f2} :0,38	Jaune Mauve
	10 %									
	80 %	R _{f1} :0,91 25	Jaune	R _{f1} :0,38 R _{f2} :0,45 R _{f3} :0,88 R _{f4} :0,95	Mauve orange Jaune orange	R _{f1} :0,38 R _{f2} :0,9	orange Jaune	-	R _{f1} :0,25 R _{f2} :0,8	Jaune Mauve
	20 %									
60 %	R _{f1} :0,87 R _{f2} :0,95	Mauve Jaune	R _{f1} :0,22 R _{f2} :0,28 R _{f3} :0,32 R _{f4} :0,77 R _{f5} :0,87 R _{f6} :0,95	orange Mauve orange Jaune Jaune Orange	R _{f1} :0,12 R _{f2} :0,15 R _{f3} :0,68	Jaune Mauve Orange	-	R _{f1} :0,37 R _{f3} :0,81	Jaune Mauve	
40 %										

Tableau 05 : Les résultats de la CCM (polyamide).

Les résultats de la CCM (polyamide) effectuées pour les extraits dans le système solvant Toluène / Méthanol (90% :10%) ;(60% :40%) bon séparation dans la fraction d'acétate d'éthyle

		l'acétate d'éthyle	
Dichlorométhane / Méthanol	96% : 4%		Jaune Orange Orange Mauve Jaune Orange Jaune Mauve Orange
Chloroforme /Méthanol/ Acétate d'éthyle	90% : 5% : 5%		Jaune Orange vert Mauve

Tableau 06: Les résultats de la CCM (Bidirectionnelle).

Les résultats de la CCM (Bidirectionnelle) effectuées pour les extraits dans le système solvant :

-1^{er} dimension : Dichlorométhane / Méthanol (96% :4%).

-2^{ème} dimension : Chloroforme /Méthanol/ Acétate d'éthyle (90% :5% :5%).

La résultat de la chromatographie CCM (Bidirectionnelle) c'est la même résultat de la chromatographie CCM (Polyamide) ; alors on peut négliger CCM (Bidirectionnelle).

Les résultats de la chromatographie sur couche mince ont révélé la présence de plusieurs classes flavoniques (**tableau 02**) dans la composition chimique de la plante *Cotula cinerea*.

Conclusion Générale

Conclusion :

Notre contribution à élucider la composition chimiques de la plante *Cotula cinerea* notamment en principes actifs, nous a permet de tirer quelles que conclusions :

- D'après les résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM), nous avons constaté que les groupements (ou composés) flavoniques les plus abondants dans l'extrait hydro-alcoolique.

D'autre parte, l'utilisation de deux type des plaques CCM (gel de silice et polyamide) nous a permet de voir l-influence de la phase stationner sur la séparation et les résultats obtenus sont comme suite :

- L'éluant : dichlorométhane / méthanol ;chloroforme/méthanol/acétate d'éthyle (gel de silice) ; toluène/méthanol : 90-10 ;60-40(polyamide) nous a donné une bonne séparation pour l'extrait éther de pétrole/ acétate d'éthyle ; acétate succivement
- L'utilisation des plaques CCM en gel de silice nous a permet de caractériser les composés :flavonols aurones , isoflavonoles, flavonols aglycone et glycosylés .
- Les composés révèlent par les plaques CCM en polyamide sont : flavonole aurones , isoflavonoles
- La chromatographie bidirectionnelle par l'utilisation des plaques en gel de silice illustrées les même résultats obtenus par la plaques CCM en polyamide

Notons enfin que ce travail nous a permis de maîtriser plusieurs techniques d'analyse de pointe et notre contribution va ouvrir des horizons de recherche très ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides, notamment en terme de mise en évidence des principes actifs.

Références

- [1]GHABRIER J. Y., 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France)
- [2]SANAGO R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali).
- [4]METWALLY et *al.*, 1986
- [5]GREGER et HOFER, 1985).
- [6]PELT, 1980 .
- [7]BENGHANOU, 2012 .
- [8]SARNIMANCHADO et CHEYNIER, 2006.
- [9]Marin FR, Frutos MJ, Perez-Alvarez JA., (2002) : Flavonoids as nutraceuticals :Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation Studies in Natural products Chemistry . Elsevier Science BV 26,p . 741- 78.
- [10]Chaouche T.M ;(2014) ;Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales.présenté pour obtenir le grade de Doctorat en biologie,Option :Biochimie ; université Abou Bah Belkaïd Tlemcen
- [11]Hogan D, Koler R., (2002) ;Why are bacteria referactory to antimicrobials. Current opinion in Microbiology 5 : 272-4.
- [13]Cuendet M ; (1999) : Recherche de nouveau composés capteurs de radicaux libre et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie :fagraeablumel et de trois plantes d'altitude :Bartsiaalpina ,LoiseleuriaprocumbensetCampanulabarbata.Thèse de doctorat ,Faculté des sciences de l'Université de Lausanne,p.24.
- [12] Vermerris W.,Nicholson R., (2006) : phenolic compound biochemistry, Springer ,Dordrecht.ISBN-10 1-4020-5163-8
- [14]Bruneton J (1993 ; 1999) : Pharmacognosie : Phytochimie& Plantes médicinales. 2^e ; 3^eéd. Editions techniques et documentation & éditions médicales internationales, Lavoisier, Paris, France.
- [15]Belkhiri, F. (2009). Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus caeruleus* L. Mémoire de Magister, Université de SETIF : 26-27-47.
- [16]Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. ;(2003). The role of antioxydant. Phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedientsis 1(4) : 119-125.
- [17]Lebham, (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

- [18] BENHAMMOU N., 2011- Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en biologie. Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 113 p.
- [19] EDENHARDER R., GRÜNHAGE D., 2003- Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tertbutyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* Vol. (540) : 1–18.
- [20] HELLER W., FORKMANN G., 1993- The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. *Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology.* Ed. Chapman et Hall, London. UK. Pp 399-425.
- [21] AKROUM S., 2011- Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine. Algérie. 113 p.
- [22] YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R., Chen S.S., 2004- Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* Vol (59) : 113-122.
- [23] [16] R. Seghiri., "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea* : *C. Africana*, *C. Nicaensis*", These doctorat, Université Constantine-55
- [24] Harborne J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1997 ; 14 : 83-98.
- [25] Hagerman A. E. and Butler L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 1981 ; 256 : 4494-4497.
- [26] Horn, J., Hayes, J., Lawless, HT.(2002). Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chem. Senses* 27 (7) : 653-9.
- [27] M. PARIS, M. HURABIELLE.. *Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie).* Tome 1 Masson, Paris 1981, p 1-3,5-10.
- [28] Seigler DS. *Plant secondary metabolism.* Ed. Kluwer Academic, Boston, 1998, p. 193-205.
- [29] Séverine. (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants .Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat .Univercité de Toulouse : 58-60-62.
- [30] Sarni-Manchado P and Cheynier V. *Les polyphénols en agroalimentaire.* Ed. Tec & Doc, Paris, 2006,p. 2-10.

- [31] Andersen YM and Markham KR. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006, p. 553-616.
- [32] GILBERT B. L., NORRIS D. M., 1968- A chemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. *J Insect physiol.* Vol. (14): 1063-1068.
- [33] BENAYACHE F., 2005- Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri Constantine. Algérie. 199 p.
- [34] COWAN N. M., 1999- Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews.* Vol. 12(4) : 564-582.
- [35] HOSTETTMANN K., 1992- Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland. 25 p.
- [36] HOULT J. R. S., PAYA M., 1996- Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine : Natural Products with Therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* Vol (27) : 711-722.
- [37] Kansole M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- [38] (Bhat S. V., Nagasampagi B. A., Sivakumar M., 2005- Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India. , Ch. 4 : 237.
- [39] Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* (105) : 358-367.
- [40] CALSAMIGLIA S., BUSQUET M., CARDOZOP W., CASTILLEJOS L., FERRET A., 2007- Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science.* Vol. (90): 2580–2595
- [41] Klyne, W., Tame, N.D. La chimie des stéroïdes, Paris, 13, 1966.
- [42] Baker, R. A., Evans, D.A., Grayson, D.D.H., Jones, R.C.F., Lough, A.K., Moore, P.R., Thaller, V. Aliphatic and related natural product chemistry, 1979.
- [43] A. Benseguni., Thèse de magister, Univ de Constantine, 1989.
- [44]. 1993. المعارف منشأة. الثانية الطبعة. فوائدها انتاجها كيميائها العطرية و الطبية الاعشاب عمر. ع. و ع. هيك. س. م.
- [45]. K. Maizak, R. A. Brac de la perriere, V. Hammiche., 'Pharmacopée traditionnelle : Sahara septentrional', actes du 2eme colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, 1993, 169-181.
- [46]. P. Ozenda., 'Flore et végétation du Sahara', éd Paris, 1993.

- [47] M'barka bouziane ; Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante : *Cotula cinerea* de la région de Ouargla , 2002.
- [48]. Dr. Abdelmadjide chahma ; catalogue des plantes spontanées des sahara spontorionale algérien
- [49]. A. Ahmed. El sayed, N. H. El Negoumy., *J. Nat prod*, 1987, 50, 519-520.
- [50] G.H. Mahran., *Bull.Fac.Farm*, Cairo Univ, 1975, 14(1), 237-246.
- [51]. M.Markouk, H. B. Lazrek, M.Jana., *Fitotherapy research*, 1999, 13(3), 229-230.
- [52]. A. Radwane, M. Markouk, H. B. Lazrek, H. Amarouch, M. Jana., *Ann. Pharm. Fr*, 1998, 56(6), 274-276.
- [53]. G. Fournier., *Planta Med*, 1989, 55(6), 580.
- [54]. M. Larhsini, M. Markouk, J. T. Jaouhari, K. Bekkouche, H. B. Lazrek, M. Jana., *Thérapie*, 1999, 54(6), 759-761.
- [55]. M. Markouk, H. B. Lazrek, M. Larhsini, K. Bekkouche, M. Jana., *Ann Pharm.Fr*, 1998, 56(6), 274-276.
- [56]. J.Brutneton., 'pharmacognosie phytochimie plantes médicinales', 2ème éd, 1993.
- [57]. Riov J., Gottlieb H.E., 2006- Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*, 50: 347-35.
- [58]. Audigié CI., Dupont G., Zonzain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome I. Chap. 2: Méthodes de fractionnement: filtration, sédimentation (centrifugation et ultracentrifugation), électrophorèse, chromatographie. Doin Editeurs, Paris, 1995: 7-84.
- [59] Bourguet E., Auge C. Les techniques de laboratoire: Purification et analyse des composés organiques. Chap. 2: L'extraction; Chap. 5: La chromatographie. Ellipses Edition Marketing S.A., 2008: 19-27; 77-96.
- [60]. http://www.exchem.fr/introduction_a_extraction.htm .
- [61]. Dhaliwal A. Extraction et purification de l'ADN. Rutgers University, New Jersey, United States. 2013.
- [62]. Mahuzier G., Hamon M., Ferrier D., Prognon P. Chimie analytique. Méthodes de séparation. Tome 2. 3ème édition. Masson, Paris, 1999: 1-312.
- [63]. Burgot G., Burgot J-L. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Partie I: Méthodes de séparation chromatographiques et électrophorétiques. Editions Médicales internationales. 2ème édition, TEC & DOC, 2006: 3-194.
- [64]. BUCHANAN., 2008- Métabolites secondaires. Cap. 24.

[65] . BADIAGA M., 2011- Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologique de *Nauclea latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au mali. Thèse de doctorat en chimie organique. Université de bamaco Mali.

[66]. BOUAL Z., 2009- Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.

[67] JEAN B, LAVOISIER., 2009- Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 4^{ème} édition. Paris.

[68] CHAOUCH NOURA ,Génie chimie au laboratoire ;2012 ;2013 .

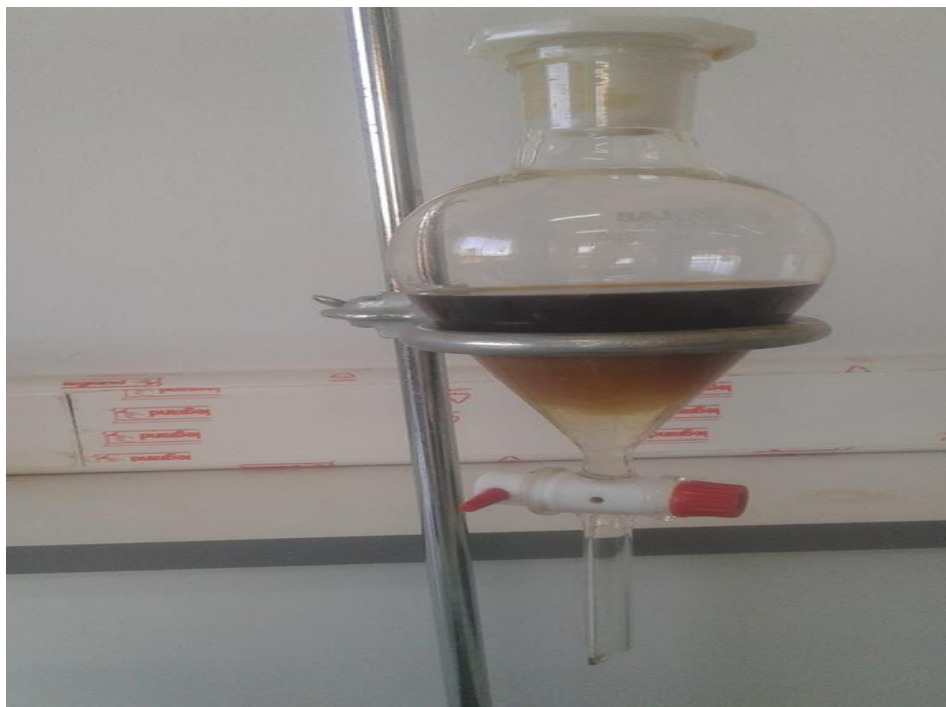
[69] Cours de magister ;profession Bein Dbi(2008). Université de Ouargla

Annexe 01



Extraction par macération

Annexe 02



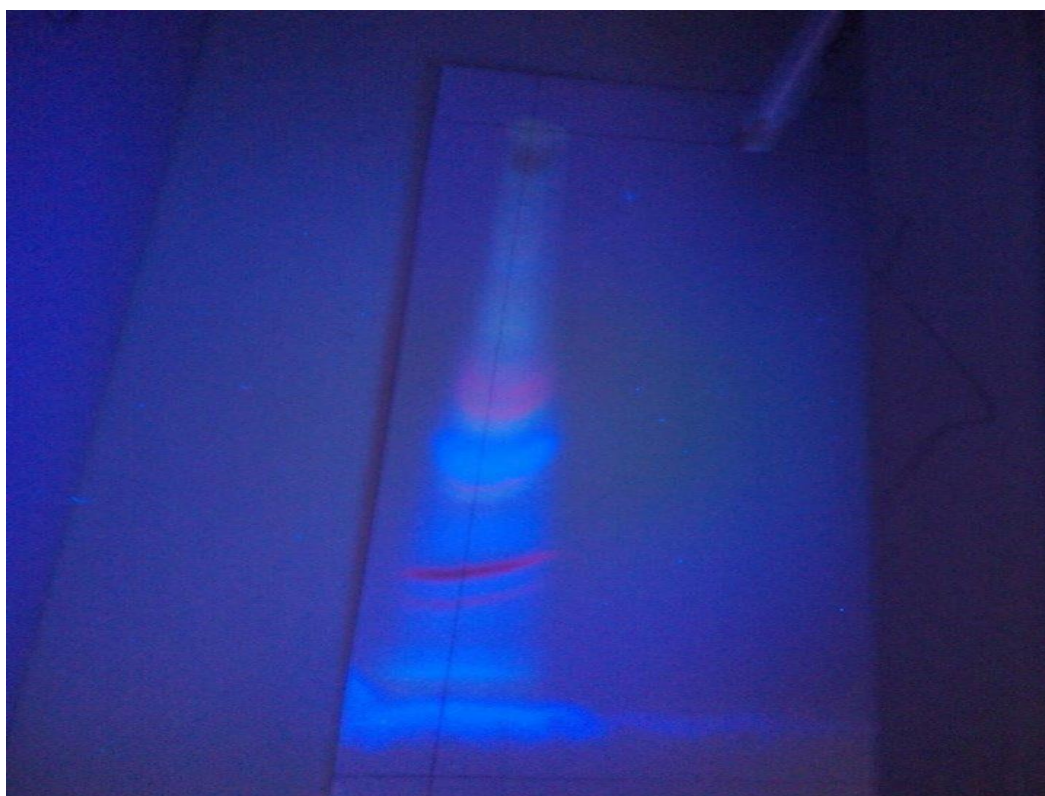
Extraction liq-liq

Annexe 03



Rotavapor

Annexe 04



Plaque CCM sous la lampe UV