

Abréviations utilisées :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

cm : centimètre

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute pression

LDL : Lipoprotéine de basse densité

MeOH: Méthanol

mg : milligramme

MH: Muller-Hilton

ml : millilitre

nm : nanomètre

PDA : Potato Dextrose Agar (dextrose de pomme de terre et agar)

Pf : point de fusion

pH : Potentiel hydrogène

ppm : Partie Par Million

Rf : facteur de rétention

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UV : Ultra-violet

μl : Microlitre

Sommaire

Abréviations

Introduction générale1

Chapitre I: Les flavonoïdes

1. Introduction.....	5
2. Définition des flavonoïdes	5
3. Structure chimique.....	6
4. Classification.....	6
4.1. Les flavones.....	6
4.2. Les flavonols.....	7
4.3. Les flavanones	7
4.4. Les isoflavones	8
4.5. Les chalcones.....	8
4.6. Les aurones.....	9
4.7. Les flavanols.....	9
4.8. Les dihydroflavonols.....	10
4.9. Les anthocyanes.....	10
4.10. Les neoflavones	10
5. Les substitutions des flavonoïdes	11
5.1. La glycosylation.....	11
5.1.1. La C- glycosylation	12
5.1.2. La O- glycosylation.....	12
6. Distribution et localisation	13
7. Biosynthèse	14
8. Propriétés pharmacologiques	16
9. Conclusion	17
Bibliographie.....	18

Chapitre II : Etude ethnobotanique du genre *Inula viscosa* (composée)

1. Introduction.....	22
2. Description botanique.....	22
3. Le genre <i>Inula</i>	22

4. Usages traditionnels.....	23
5. Présentation de la plante <i>Inula viscosa</i>	24
5.1. Taxonomie.....	24
5.2. Place dans la systématique.....	24
5.3. Description de la plante.....	25
6. Usage traditionnelle d' <i>Inula viscosa</i>	25
7. Travaux antérieurs sur le genre <i>Inula</i>	26
7.1. Les flavonoïdes.....	27
7.2. Les sesquiterpènes lactones.....	30
7.3. Les terpènes.....	31
7.4. Les huiles essentielles.....	32
8. Propriétés pharmaceutiques.....	33
9. Conclusion.....	34
Bibliographie.....	35

Chapitre III : Etude phytochimique de la plante *Inula viscosa*

1. Matériel et méthodes.....	39
2.1. Préparation du matériel végétal.....	39
2.2. Méthodes.....	39
2.2.1. Extraction.....	39
2.2.2. Concentration.....	41
2.2.3. Séparation des flavonoïdes.....	41
2.2.3.a. Chromatographie sur couche mince.....	41
2.2.3.b. Chromatographie sur colonne.....	42
3. Résultats et discussion.....	45
4. Conclusion.....	53
Bibliographie.....	54

Chapitre IV : Mise en évidence de l'activité biologique de l'extrait hydro-alcoolique

1. Introduction.....	56
2. Matériels et méthodes.....	57
2.1. Matériel végétale.....	57

2.1.1. Extraction par la méthode de lixiviation.....	57
2.1.2. Préparation du lyophilisat.....	57
2.1.3. Préparation des extraits.....	58
2.2. Origine des souches microbiennes testées.....	58
2.2.1. Souches bactériennes.....	58
2.2.2. Souche fongique.....	60
3. Milieu de culture.....	60
4. Conservation des cultures microbiennes.....	60
5. Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la plante <i>Inula viscosa</i>	61
5.1. Préparation des précultures microbiennes.....	61
5.2. Teste d'activité antimicrobienne.....	61
6. Recherche de l'activité antibactérienne	61
7. Résultats et discussions.....	62
8. Conclusion	63
Bibliographie.....	69
Conclusion Générale	71
Annexes.	

Introduction générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies. Jusqu'à maintenant les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. D'après les études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes¹.

Les biologistes et les chimistes reconnaissent l'importance majeure des produits naturels et les limites des méthodes et des techniques de biotechnologie ainsi que la chimie, ce qui peut expliquer le grand intérêt porté à la recherche de composés issus des sources naturelles.

Les plantes avec leur nombre illimité constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et d'activités biologiques. Les plantes aromatiques sont caractérisées par leur richesse en principes actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes qui sont dotées des propriétés importantes et différentes.

Le premier chapitre du présent travail est consacré principalement à la description des flavonoïdes, en commençant par leur définition, localisation et leur classification. Nous nous intéressons ensuite à leur biosynthèse et l'intérêt pharmacologique, ainsi que leurs différentes activités.

Le deuxième chapitre représente les travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques du genre *Inula* ainsi qu'aux études chimiques antérieures réalisées sur le genre.

¹ K.Damintoti, H.D.Mamoudou, S.acques, Y.Saydou, S.Souleymane, S.T.Alfred, Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso, (2005).

Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés à :

- L'extraction des flavonoïdes.
- L'identification des produits séparés par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques.

Et enfin, le chapitre quatre est consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-alcoolique de la plante *Inula viscosa*.

ClicCours.com

Chapitre I
Les flavonoïdes

1. Introduction :

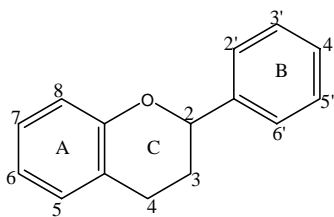
Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aures et les anthocyanes.

De ce fait, ce chapitre est consacré principalement à la description des flavonoïdes, en commençant par leur définition, leur localisation et leur classification. Nous nous intéressons ensuite à leur biosynthèse et l'intérêt biologique, ainsi que leurs différentes activités.

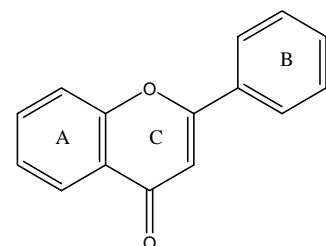
2. Définition des flavonoïdes:

Le nom flavonoïde provient du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [1], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) [2, 3].

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ce sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.



Noyau flavane



Noyau flavone

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes, date de la découverte de la vitamine C à la suite des travaux de Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937) [4], qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron riche en vitamine C et des flavonoïdes [4, 5].

Alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque [5].

Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) [4, 5].

3. Structure chimique:

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [6]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [7], en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [8].

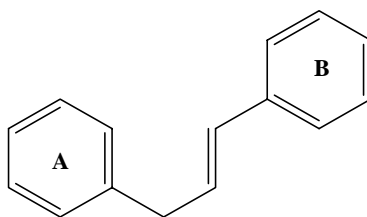


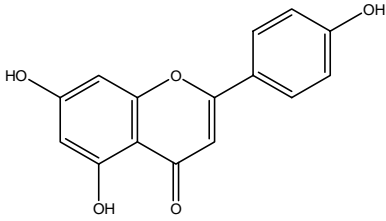
Figure 1 : Squelette de base des flavonoïdes

4. Classification :

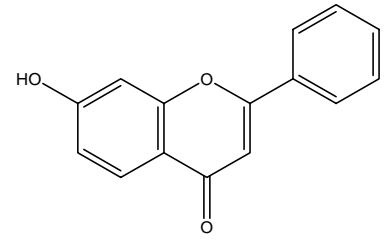
Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes [9].

4.1. Les flavones :

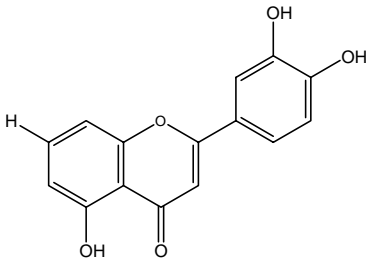
Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base [9].



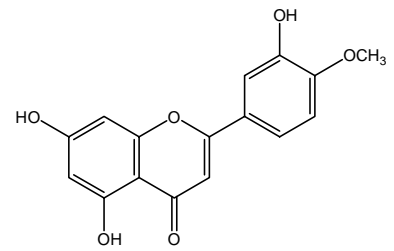
Apigénine



Chrysin



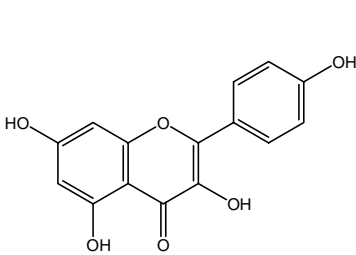
Lutéoline



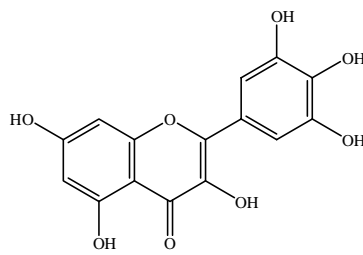
Diosmétine

4.2. Les flavonols :

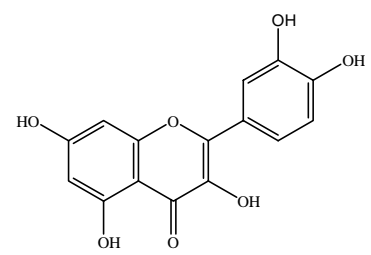
Elles se différencient des flavones par l'existence d'un hydroxyle en position 3, qui n'est pas un OH phénolique. Ce sont les flavonoïdes les plus répandus.



Kamphérole



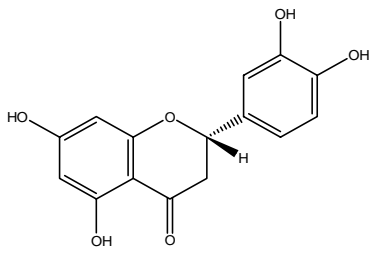
Myricétine



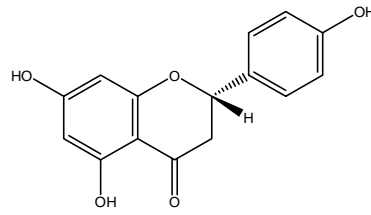
Quercétine

4.3. Les flavanones :

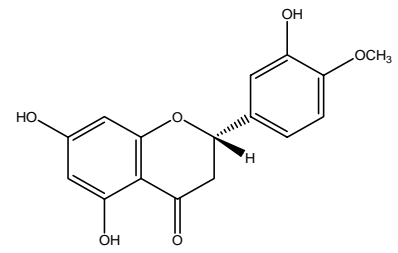
Ce sont des dérivés des flavones. Ces composés possèdent un carbone asymétrique (C₂). Il existera donc 2 isomères optiques pour chaque composé.



Eriodictyol



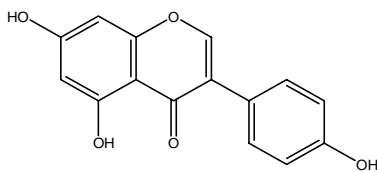
Naringénine



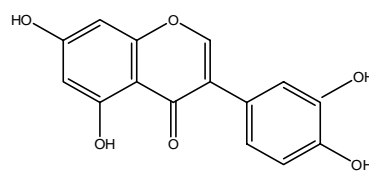
Hesperitine

4.4. Les isoflavones :

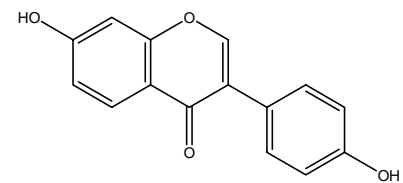
Les isoflavones sont des isomères des flavones. Le noyau benzénique latéral est fixé en position 3 et non pas en position 2. Ces composés se trouvent essentiellement dans les légumineuses [10, 11].



Génistéine



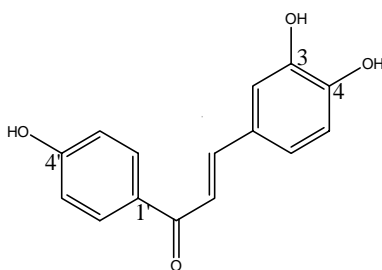
Orodol



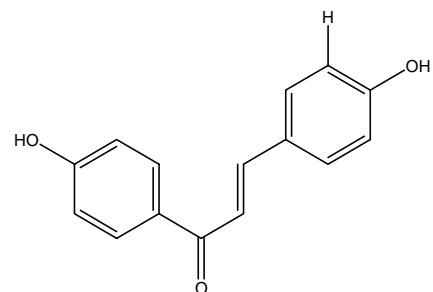
Daidzéine

4.5. Les chalcones :

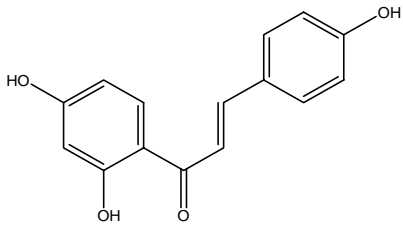
Les chalcones se différencient des structures précédentes par l'existence d'un chaînon tricarboné, cétonique α - β insaturé au lieu de l'hétérocycle oxygéné qui relie les deux cycles benzéniques [12].



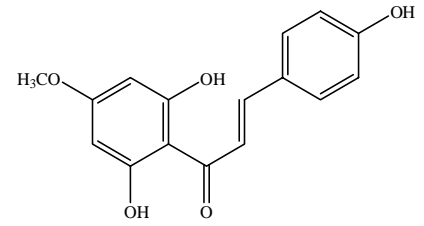
Butéine



isoliquirigénine



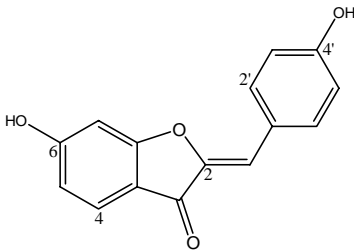
Davidiigénine



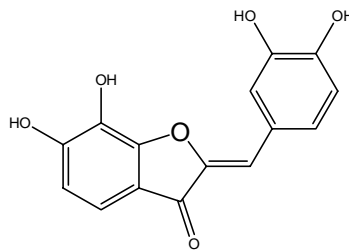
Asebogénine

4.6. Les aurones [13]:

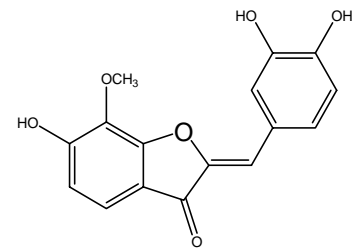
Dans le cas des aurones, il existe un hétérocycle à cinq chaînons et non pas à six chaînons.



Hispidol

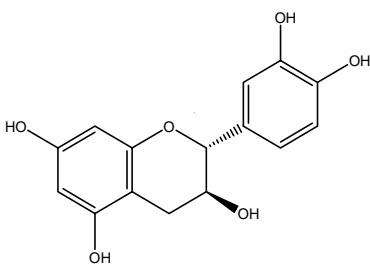


Maritimétine

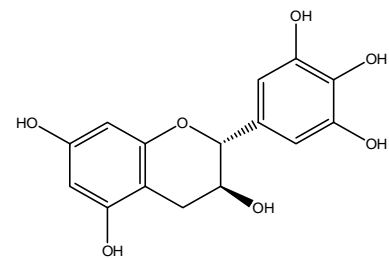


Leptosidine

4.7. Les flavanols :

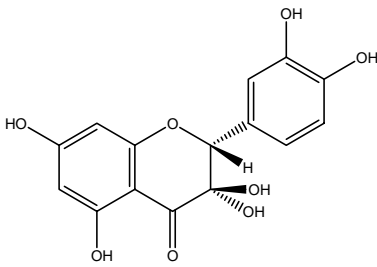


Catéchine

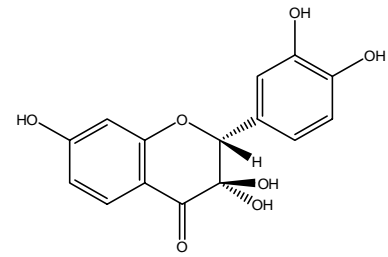


Gallocatéchine

4.8. Les dihydroflavonols :



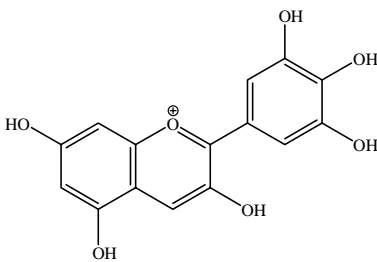
Taxifoline



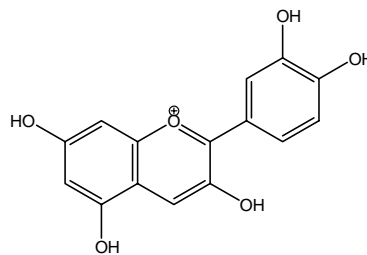
Fusétine

4.9. Les anthocyanes :

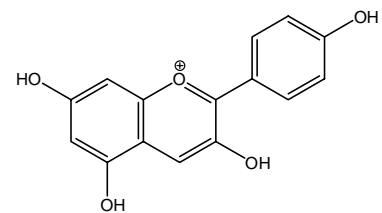
Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélargonidol, Delphinidol et le cyanidol.



Delphinidol



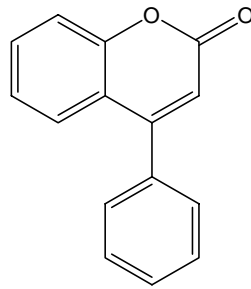
Cyanidol



Pélargonidol

4.10. Les neoflavones :

Les neoflavones sont caractérisées par la substitution entre le groupement carboxyle et le noyau B dans le squelette des flavones [14]. Les neoflavones sont des flavonoïdes rares, cette rareté est due leur faible présence dans la nature contrairement au flavones et flavonols [15].

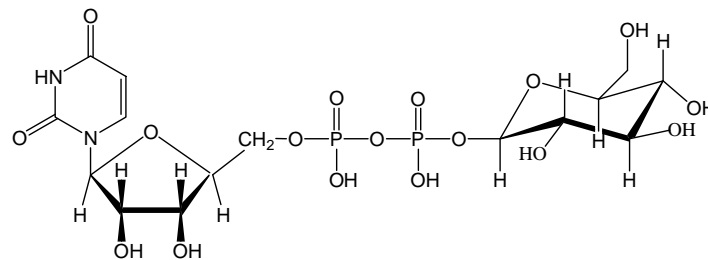


Neoflavone

5. Les substitutions des flavonoïdes:

5.1. La glycosylation :

Par définition, c'est l'addition d'un sucre sur le squelette flavonique. Elle se fait dans la dernière phase de la biosynthèse des flavonoïdes grâce à l'enzyme O-glucosyltransférase, cette enzyme transfère le sucre de la UDP glucose (Uridine diphosphate glucose) au groupe hydroxyle aglycone, par exemple : l'anthocyanidine avec un libre groupe hydroxyle à la position 3 est instable aux conditions physiologiques par conséquent il ne se trouve pas dans la nature sur cette forme [16]. La 3-Oglucosyl- transférase est considérée comme une enzyme indispensable dans la biosynthèse des anthocyanidines.



Uridine diphosphate glucose

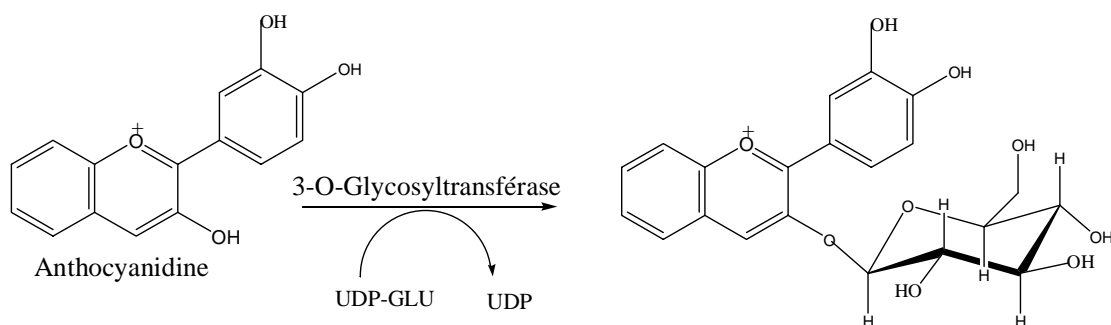


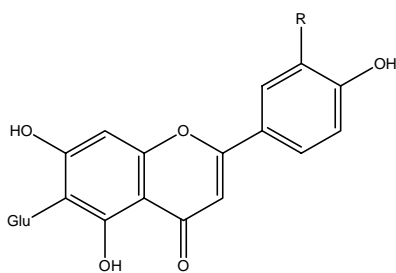
Figure 2 : substitution d'un sucre sur l'aglycone

On distingue deux types de glycosylation :

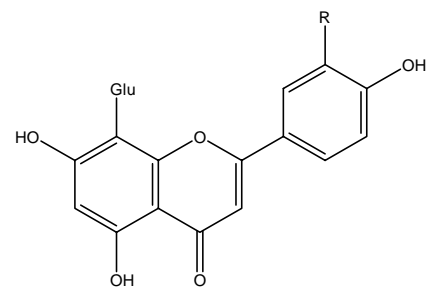
- La C- Glycosylation
- La O- Glycosylation

5.1.1 La C-glycosylation :

Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison C-C, d'une manière générale la C-glycosylation se fait en C6 ou en C8, par exemple l'isovitexine (6-C-glycosylflavone) et la vitexine (8-C-glycosylflavone) [17].



Isovitexine

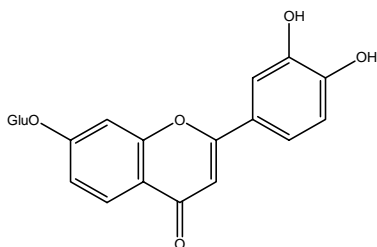


Vitexine

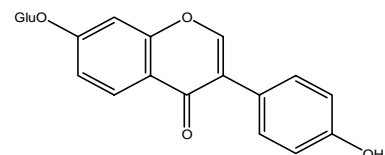
5.1.2 La O-Glycosylation :

Dans ce type de composés, hydroxyle du squelette flavonique est lié avec un autre hydroxyle alcoolique du sucre (glucose...) en présence de l'enzyme glycosyltransférase et la UDP-glu (Uridine diphosphate glucose) comme donneur du sucre.

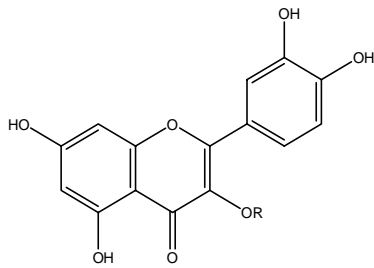
Les structures suivantes montrent plusieurs positionnements de la O-glycosylation en 7-OH et 3-OH [18].



O-Glycosyl-flavone

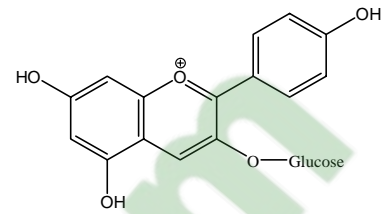


O-Glycosyl-isoflavone



O-Glycosyl-flavonol

R=glucose	Isoquercitrine
R=galactose	Hyperoside
R=rutinoside	Rutine



3-O-glucosyl-Pelargonidole

6. Distribution et localisation :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois et pollens [19]. Ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) [20].

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [21].

On trouve aussi la chrysin et la quercétine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (le bouleau, le sapin, le saule...) récoltés par les abeilles, ces insectes les fabriquent en modifiant la propolis par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches [21].

7. Biosynthèse :

De nos jours, plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés et isolés à partir des milliers des espèces végétales [22]. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 [23].

Leur biosynthèse (**Figure 3**) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavonesynthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3.

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonolsynthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7) (**Figure 3**). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées.

Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside (**Figure 3**). Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelé aglycone.

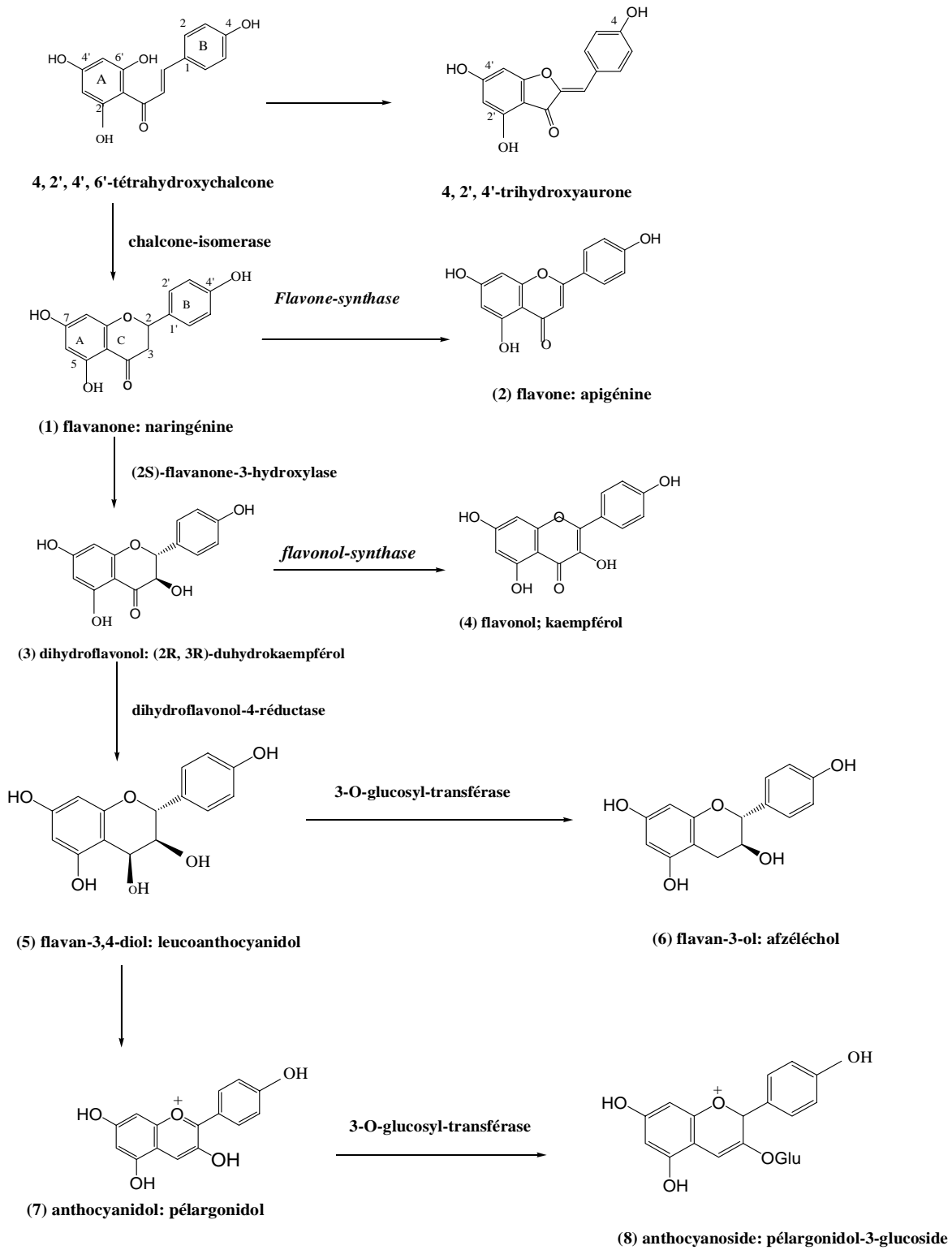


Figure 3: La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999) [24].

Clicours.COM

8. Propriétés pharmacologiques :

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, inhibitrice, antivirale, antibactérienne, ... etc. Les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques.

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse ; leurs actions se situent au niveau des petites veines ou des capillaires : on a une diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (action de la vitamine P). Ce sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires [4,5].

Dans l'industrie alimentaire, les flavonoïdes sont utilisés comme colorants et édulcorants, certains anthocyanes sont des colorants végétaux autorisés à usage pharmaceutique et alimentaire (E163). Ils sont utilisés dans les produits de charcuterie, dans les produits laitiers, glaces et crèmes glacées, conserves de fruits et légumes[25].

En agricultures, des expériences ont montré que certains représentants de la famille des flavonoïdes notamment le flavonol et le flavone sont efficaces pour la lutte contre les champignons pathogènes des grains de céréales [26].

De nombreux travaux ont montré que les fruits, les légumes, le thé et le soja constituent les sources alimentaires des flavonoïdes les plus étudiées [27, 28, 29]. Les colorants des baies fortement colorées telles que les baies rouges, les myrtilles et le cassis, sont des flavonoïdes appelés anthocyanes. Ils peuvent jouer un rôle dans la prévention des cardiopathies [29].

Dans des expériences réalisées sur les rats, il a été démontré que la quercétine et la nargénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques [30]. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotiène.

La teneur en flavonol et en flavone des aliments végétaux est fortement influencée par facteurs tels que la variation du type de croissance, la saison, le climat et le degré de maturité [31].

La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant chélateur. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé. Grâce à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, les flavonoïdes ont démontré des effets cardioprotecteurs importants [32, 33].

Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [34].

Conclusion:

En conclusion, on peut dire que les flavonoïdes sont des molécules d'une grande diversité structurale. Dotés d'une grande activité pharmacologique, ils représentent une source primordiale pour la découverte de nouveaux médicaments et également une source d'inspiration pour la chimie médicinale.

Bibliographie :

- [1] J.Bruneton, *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4^e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. p 1288, (2009).
- [2] A.Karaali, D.Boyacioğlu, G.Günez, B.Özçelik, Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. European commission's the 6th frame work programme for research. *Istanbul technical university. Turkey*, (2004).
- [3] D.Malešev, V.Kuntić, Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*. 72 (10) : 921-939, (2007).
- [4] A.Marfaik, Radiolyse Gamma des Flavonoïdes : Etude de Leur Réactivité avec Les radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. p 187, (2003).
- [5] M.Hadi, La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p, (2004).
- [6] J.W.Erdman, J.D.Balentine, L.Arab, G.Beecher, J.T.Dwyer, J.Folts, J.Harnly, P.Hollman, LC. Keen, G.Mazza, M.Messina, A.Scalbert, J.Vita, G.Williamson, J. Burrowes. Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31-June 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 137(3 suppl): 718 s-737 s, (2007).
- [7] V.P.Emerenciano, K.O.Barbosa, M.T.Scotti, M.J.P.Ferriro, Selforganising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribe's using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*. 18 (5): 891-899, (2007).
- [8] K.R.Narayana, M.S.Reddy, M.R.Chaluvadi, D.R.Krishna, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. 33: 2-16, (2001).
- [9] A.Szent-Gyorgyi, Methoden zur Herstellung von citrin. *Chem*. 255: 126-131, (1938).
- [10] J.B.Harborne. (Eds), phytochemical dictionary of the leguminosae, vol.1, chapman and hall, London. pp XX-XXII, (1994).
- [11] H.A Stafford. Role of Flavonoids in symbiol and defuse functions in legume roots, *Bot.rev*. 63: 27-39, (1997).
- [12] P.Sarni-Manchado, V.Cheyrier, Les polyphénols en agroalimentaire. Edition, Tec & Doc. *Collection: sciences et techniques agro-al*, (2006).
- [13] M.Skerget, P.Kotnik, M.Hadolin, A-R.Hras, M.Simonic, Z.Knez, Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food chemistry*. 89: 191-198, (2005).

- [14] W.B.Eyton, W.D.Ollis, I.O.Sutherland, O.R.Gottlieb, M, Taviramagalhaes. *Proc. Tetrahedron*. 21: 2683, (1965).
- [15] H.Elhazimi, *Natural product*. 149-190, (1995).
- [16] G.Forkmann, W.Heller, Biosynthesis of flavonoids. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Edited by SankawaU. Amsterdam, Elsevier.713-748, (1999).
- [17] K.R.Markham, The Technique of Flavonoids Identification, *Academic press, London, New York*, (1982).
- [18] S.Kazuno et al, Identification and Quantification of glycosyl Flavonoids. *Anal. Biochem*. 347: 182-192, (2005).
- [19] M.E.Verhoeven, A.Bovy, G.Collins, S.Muir, S.Robinson, C.H.R. De Vos, S.Colliver, Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*. 53 (377): 209 -210, (2002).
- [20] I.Urquiaga,F.Leighton, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 33(2) : 55-64, (2000).
- [21] M.Lahouel, Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine, (2005).
- [22] I.Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology, *Nutr Res*. 24: 851-74, (2004).
- [23] J.Bruneton, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier. (3^{ème} éd). Paris. 1120p, (1999).
- [24] J.Bruneton, Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales, 3^{ème} édition, édition lavoisier, (1993).
- [25] Moll Manfred, Moll Nicole, Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques Dunod, Paris. 25-56, (1998).
- [26] W.Kalt, J.McDonald, Agriculture et agroalimentaire Canada, Centre de recherches de l'Atlantique sur les aliments de l'horticulture, Kentville, N.E. B4N1J5, (2000).
- [27] M.Cabrera, M.Simoens, G.Falchi, M.L.Lavaggi, O-E. Puo, E-E. Castellano, A.Vidal, A.Azqueta, A.Monge, A.L.Cerain, G.Sagrera, G.Seoane, H.Grecetto, M.Gonzalez, Synthetic chalcones, flavanones and flavones as antitumor al agents: Biological evaluation and structure activity relationships, *Bioorganic et Medical Chemistry*.15: 3356 -3367, (2007).
- [28] N.Gervais, Aliments fonctionnels et produits nutraceutiques. Les fibres, les vitamines et les autres éléments nutritifs. *Le médecin de Québec*. 36(4) : 64-68, (2001).
- [29] K.Pelli, M.Lyly, Les antioxydants dans l'alimentation. *Finlande*. p 28, (2003).

- [30] A.A.Izzo, PAF and the digestive tract. A review. *J. Pharm Pharmacol.* 48: 1103-11, (1996).
- [31] A.Lugasi, J.Hovari, K.Sagi, V.Birol, The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szeged.* 47, 119-125. (2003).
- [32] L.Hooper, P.A.Kroon, E.B.Rimm, J.S.Cohn, I.Harvey, K.A.Le Cornu, J.J.Ryder, W.L.Hall, A.Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 88: 38-50, (2008).
- [33] S.B.Lotito, B.Frei, Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 1727-1746, (2006).
- [34] K.C.Ong, H.E.Khoo, Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 67: 1695-1705, (2000).

Chapitre II

Etude ethnobotanique du genre

Inula (composées)

1.2. Introduction :

La famille des composées est l'une des plus distribuée dans le règne végétal. Cette famille comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [1,2]. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces [3], 111 genres et 638 espèces [2]. Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: Laitues (*Lactuca*), Endives, Chicorée (*Cichorium*), artichauts (*Cynara*), salsifis (*Tragopogon*). Le tournesol (*Heliantus annuus*) est cultivé pour son huile riche en acide gras.

Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie : Le Semen-contra (*Artemisiacina Berge*), l'Arnica (*Arnica montana L.*), la Camomille (*matricaria chamomilla L.* et *Anthemis nobilis L.*), le pied de chat (*Antenaria diocagartn*) [1]. Une des propriétés typique de la famille des composées est sa richesse en composés naturels divers. On y trouve des terpenoides, des flavonoïdes et des alcaloïdes [4]. C'est une famille très riche en lactones sesquiterpéniques qui représentent des principes amers typiques de cette famille [4].

2.2. Description botanique :

Les composées, représentées principalement dans les régions tempérées et froides du globe [5], sont principalement des herbes vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des herbes rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, simple [6].

Selon Gaussen, les composées sont répartie en fonction de leurs fleurs en deux type : l'un ayant des fleurs à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées [2].

3.2. Le genre *Inula* :

Le nom *Inula* est très ancien et vient du nom de l'espèce *Inula helenium* et généralisé pour tout les genres. Le nom *Helenium* découlerait du grec "helen". La légende antique raconte que la fleur serait née des larmes de la belle Hélène de troie.

Le genre *Inula* comprend une variété d'environ 90 espèces. Ce sont des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternes. Capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées. Bractées en plusieurs séries. Fleurs périphériques pastillées, à ligules tridentées. Anthères sagittées à la base.

❖ répartition géographique:

Le genre *Inula* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France...), Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc...) [3].

4.2. Usages traditionnels :

La médecine traditionnelle a attribué de nombreuses propriétés thérapeutiques aux espèces du genre *Inula* [7]. Le tableau N°1 présente les multiples usages traditionnels de quelques espèces du genre *Inula*.

Tableau N°1 : Usages traditionnels de quelques espèces du genre *Inula*.

Espèces	Usages traditionnels	Réf
<i>Inula helenium</i> L.	Comme un remède familial en Japon. Comme une diaphorèse en Europe, et en Taïwan et Chine, comme un agent thérapeutique pour la tuberculose et l'entrogastrique chronique. Elle a aussi des propriétés antiseptiques, antibiotiques, antispasmodiques, toniques et aromatiques.	[8] [9]
<i>Inula britannica</i> L.	Les fleurs de ces plantes ont été utilisées pour le traitement des troubles digestifs, la bronchite, et l'inflammation. <i>Inula britannica</i> a aussi une activité anti-inflammatoire, antibactérienne, antihepatique et antitumorale.	[10]
<i>Inula royleana</i> L.	Ces racines possèdent une activité anti-inflammatoire antibiotique, et une activité vermifuge.	[11, 12]
<i>Inula racemosa</i> L.	En médecine traditionnelle Chinoise, les racines d'herbe d' <i>Inula racemosa</i> ont été habituellement employées pour fortifier la rate, réguler la fonction de l'estomac, soulager la dépression du qi de foie, alléger les douleurs rhumatismales particulièrement entre le cou et les épaules et pour empêcher l'avortement.	[13, 14]
<i>Inula montana</i> L.	Possède une activité sur le système digestif	[15]
<i>Inula salicina</i> L.	Digestif, antidiarrhéique	[15]
<i>Inula conyza</i> DC.	Laxative, vulnéraire	[16]
<i>Inula viscosa</i> L.	Possède une activité curative de blessure avec l'extrait du <i>d'Inula viscosa</i>	[17]

5. Présentation de la plante *Inula viscosa* :

5. 1. Taxonomie :

Inula : viendrait du grec : Inéo qui signifie-je purge. (Allusion à une propriété thérapeutique de la plante) [18].

Viscosa : veut dire visqueuse : Inule visqueuse [19].

5.2. Place dans la systématique :

Tableau N°2 : Taxonomie d'*Inula viscosa* [3].

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous Classe	Gamopetales
Ordre	Campunulales
Famille	Composées
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>viscosa</i> - L - AIT
Synonymie	<i>Ditrichia viscosa</i> L
Nom commun	Inule, aunée visqueuse
Noms vernaculaires	Magramane ou Amagramane.

➤ Répartition géographique :

Répandue dans tout le bassin méditerranéen, sur les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau [3], largement répandue en Algérie dans les rocailles et les terrains argileux (Figure 1) [20].



Figure 1 : *Inula viscosa*

5. 3. Description de la plante:

L'Inule visqueuse est une plante toute glanduleuse agréable (selon certains, désagréable pour d'autres), à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées. Elle est ligneuse à sa base (forte racine pivotante lignifiée pouvant atteindre 30 cm de long. Elle atteint de 50 cm à 1m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreux au sommet de la tige. Les feuilles sont entières ou dentées, aiguës [3]. C'est une plante largement répandue dans le nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen, les rocailles, garrigues, terrains argileux un peu humide et les bords des routes. Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connu depuis longtemps par les guérisseurs [21].

6. Usage traditionnelle d'*Inula viscosa* :

Considéré comme «la reine des plantes médicinales», les villageois arabes en Israël, la Palestine et la Jordanie ont utilisé l'*Inula viscosa* pour soulager ou traiter de divers maux. Le médecin arabe El Tamimi, qui a pratiqué à Jérusalem au cours du 10^{ème} siècle, a écrit que la boisson "Raesen", fabriqués à partir d'*Inula viscosa* et ajoutés au miel, a été la "boisson des rois." Il a été

efficace dans la lutte contre les rhumatismes, les rhumes, et même agi comme un aphrodisiaque. Les pratiques de la médecine traditionnelle sont documentées dans "Herbes Pouch" [22], un livre écrit en hébreu, qui comprend des entrevues et la main-première preuve d'un grand nombre utilise *Inula viscosa*.

Depuis les temps anciens, *Inula viscosa* a été largement utilisé comme traitement pour ce qui suit [22]:

Plaies	L'application de feuilles fraîches, ou une poudre de feuilles sèches ou de saignement sur des plaies ouvertes ou les résultats des brûlures à l'arrêt de l'hémorragie, et sert comme antiseptique et anti-inflammatoires agent efficace. Traitement <i>Inula viscosa</i> aide est préféré par les villageois sur des médicaments modernes, car il favorise la cicatrisation plus rapide.
Les peaux sèches et rugueuses	La poudre de la feuille <i>Inula viscosa</i> séchée est mélangée avec de l'huile et appliqué à l'extérieur des parties touchées du corps.
Hémorroïdes	Une pâte est également préparée à partir de feuilles broyées, mélangée avec de l'huile d'olive et appliquée comme une pommade.
L'hypertension artérielle et le diabète	feuilles <i>Inula viscosa</i> sont cuites à l'eau et la tonique est consommée.
Bronchite et les infections respiratoires	L'extrait est ajouté à l'eau bouillante et la tonique consommée.

7. Travaux antérieurs sur le genre *Inula*:

Un grand nombre d'espèces *Inula* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés. Les recherches phytochimiques ont permis de mettre en évidence, dans le genre *Inula* tous les composés caractéristiques :

- ✓ Flavonoïdes
- ✓ Terpènes
- ✓ Lactones Sesquiterpéniques

7.1. Les flavonoïdes:

Les composés flavoniques sont des substances naturelles très répandues dans la famille des Composées où beaucoup de travaux ont été réalisés [8]. Chez le genre *Inula* on trouve des flavonoïdes glycosylés, et des flavonoïdes aglycones.

Une étude réalisée sur l'espèce *Inula viscosa* a révélé la présence des flavonoïdes cités dans le tableau N°4 [23]:

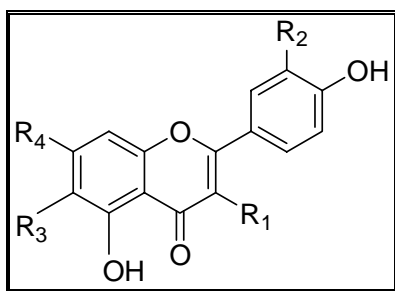
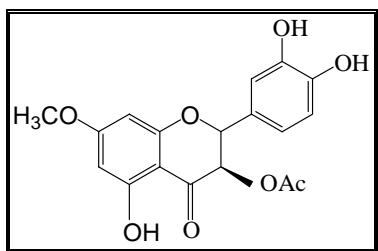
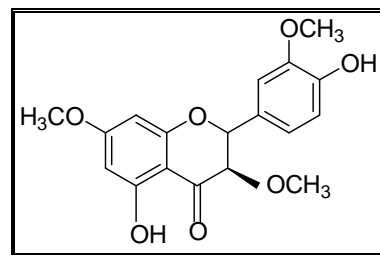


Tableau N°4: structures chimique des flavonoïdes isolés d'*Inula viscosa*

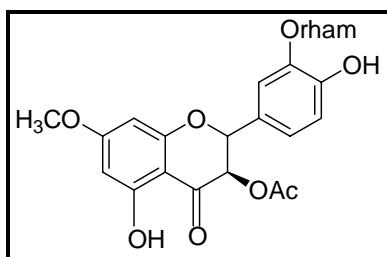
Composés	R1	R2	R3	R4
Apigénine	H	H	H	OH
Quercétine	OH	OH	H	OH
Genkwanine	H	H	H	OCH ₃
Hispiduline	H	H	OCH ₃	OH
3-O-méthylquercétine	OCH ₃	OH	H	OH
3-O-méthylkaempferol	OCH ₃	H	H	OH



3-O- acétylpadmatine



3, 3', 7-trimethoxyquercétine



3'rhamnosyl 3-O-acétylpadmatine.

- ❖ Une autre étude phytochimique réalisée sur l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Inula britannica* a permis d'isoler et identifier 12 flavonoïdes [8], (Tableau N°5).

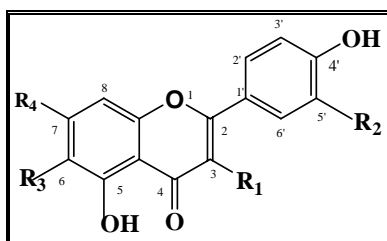
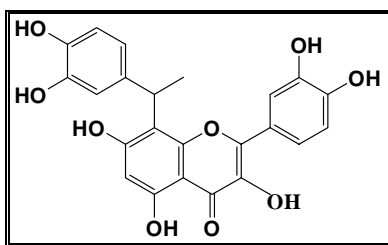


Tableau N°5: structures chimique des flavonoïdes isolés d'*Inula britannica*.

Composé	R1	R2	R3	R4
Patuletine	OH	OH	OCH ₃	OH
Patulitrine	OH	OH	OCH ₃	OGlc
Patulitrine 7-O-(6'-isobutyryl) glucoside	OH	OH	OCH ₃	(6'-isobutyryl)Glc
Patulitrine 7-O-[6'(2-methylbutyryl)] glucoside	OH	OH	OCH ₃	[6'(2-methylbutyryl)] Glc
Patulitrine 7-O-(6'-isovaleryl) glucoside	OH	OH	OCH ₃	(6'-isovaleryl) Glc
Neptine	H	OH	OCH ₃	OH
Nepitrine	H	OH	OCH ₃	OGlc
Kaempferol	OH	H	H	OH
Kaempferol 3-glucoside	OGlc	H	H	OH
Axillarine	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
Hispiduline 7-glucoside	H	H	OCH ₃	OGlc
Isorhamnetine 3-glucoside	OGlc	OCH ₃	H	OH

❖ L'investigation phytochimique réalisée sur l'extrait de l'espèce *Inula japonica* a permis l'isolement du flavonoïde nommé 8-(1-(3,4-dihydroxyphenyl) éthyl) -3, 3', 4', 5, 7 pentahydroxyflavone [24].



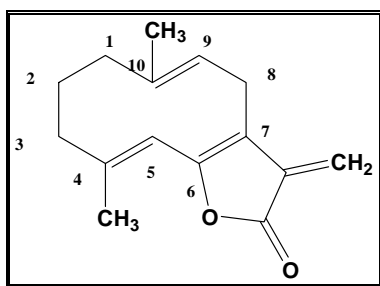
8-(1-(3,4-dihydroxyphenyl) éthyl)-3, 3', 4', 5, 7 pentahydroxyflavone

7.2. Les sesquiterpènes lactones:

Les lactones sesquiterpéniques ont une distribution botanique assez sporadique, présentes chez les angiospermes, et très majoritairement chez les composées [25].

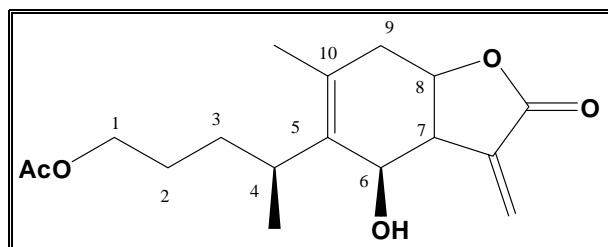
Des investigations phytochimiques réalisées sur le genre *Inula* ont permis d'isoler plusieurs lactones Sesquiterpéniques.

❖ *Inula helenium*



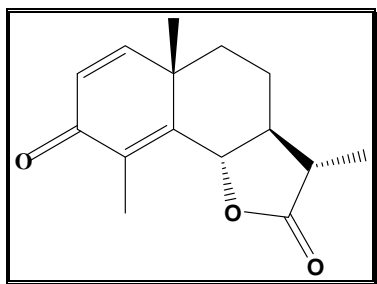
Isocostunolide [24].

❖ *Inula britannica*

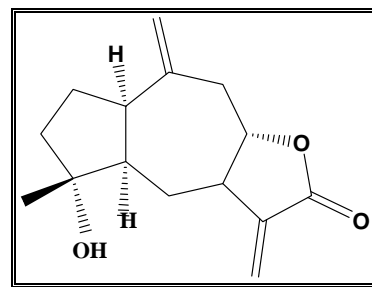


1-O-acétylbritannicalactone [26].

❖ *Inula viscosa* [23,27]

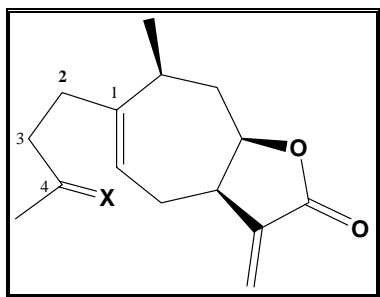


α -santonine



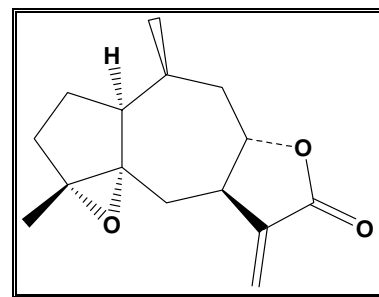
Inulviscolide

❖ *Inula graveolens* [27]



X=O: Tomentosine

X=OH: 4H-tomentosine



4 α -dehydroxy 4 α , 5 α

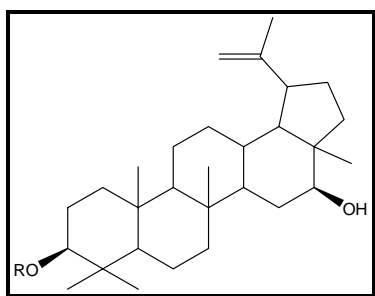
époxy-14H-1-inuviscolide

7.3. Les terpènes:

Les terpènes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques et des activités biologiques très diverses. Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle [28].

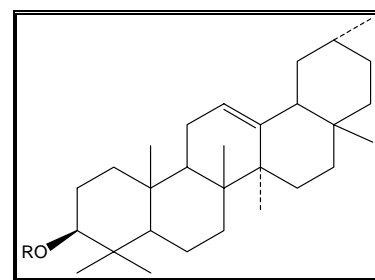
Des travaux effectués sur certaines espèces du genre *Inula* ont permis d'isoler des triterpènes.

❖ *Inula britannica* [23]



3 β , 16 β -dihydroylupeol 3-palmitate (R=CH₃ (CH₂)₁₄ CO)

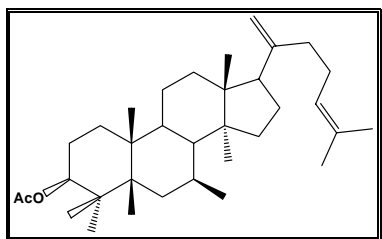
3 β , 16 β -dihydroylupeol 3-myristate (R=CH₃-(CH₂)-CO)



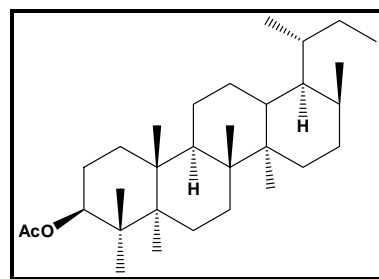
B-amyrinpalmitate

(R=CH₃-(CH₂)₁₄CO)

❖ *Inula viscosa* [29, 30]



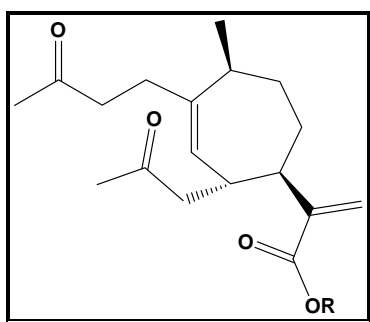
3β-acetoxydammara-20, 24-diène



γ taraxasterol acétate

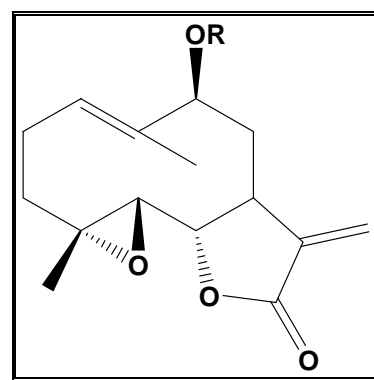
❖ *Inula verbascifolia* [31]

Une étude effectuée sur les parties aériennes de l'espèce *Inula verbascifolia* a révélé la présence de deux nouveaux xanthanes et un germacranolide.



6-α acétyl-4-oxobedforddic acide (R=H)

6-α-acétyl-4-oxobedfordiaic methyl ester (R=CH₃)



9β-(3-methyl-pentoyl-3-ene)-parthenolide

7.4. Les huiles essentielles :

Le calcul des rendements des huiles essentielles de la plante se fait en deux états : un état sec et un état frais sont rapportés dans le tableau suivant:

Tableau N°6 : rendements des huiles essentielles de la plante sèche et fraîche [32].

Plante	<i>Inula viscosa</i>	
	Fraiche	Sèche
Rendement(%)	0.24	0.32

L'analyse qualitative et quantitative d'huile essentielle par CG/MS explique cette évaluation de l'efficacité antifongique par la présence des fortes concentrations des sesquiterpènes et plus particulièrement les carboxyudesmadienes dans les feuilles de cette plante. Les travaux d'Abu Zarga et al ont décrit la présence en plus de 14 composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Inula viscosa* de la région jordanienne, 6 nouveaux sesquiterpeniques de type eudesmane. Ces composés sont l'acide 3 β -hydroxyilicique, l'acide 3 α -hydroxy-epiilicique, l'acide 2 α -hydroxyilicique, l'acide 9 β -hydroxy-2-oxoisocostique, l'acide 1 β -hydroxyilicique et l'acide 2 β -hydroxyilicique [33, 34].

8. Propriétés pharmaceutiques :

Inula viscosa est largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle marocaine, surtout dans le milieu paysan, pour le traitement de diverses affections ou maladies telles que les bronchites et le diabète [35].

Elle est utilisée pour ses activités : anti-inflammatoires [36], antidiabétiques [37], antipyrétiques, antiseptiques [38] et pour le traitement des troubles gastroduodénaux [39].

Un effet antiulcérogénique a été attribué à la présence des flavonoïdes d'*Inula viscosa* [39]. L'extrait flavonique et l'huile essentielle d'*Inula viscosa* montrent une activité antifongique contre les dermatophytes [40].

L'inule visqueuse possède une activité biologique (antimicrobienne et antifongique). Elle a été utilisée couramment pour prolonger la durée de conservation de nourriture et dans la médecine traditionnelle [41].

L'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles et des fleurs, de la plante entière et de la plante entière sans fleurs d'*Inula viscosa* contre les dermatophytes [42], *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton terrestre*. La cible principale de cet effet est l'inhibition de la synthèse d'ergostérol et par conséquent, l'inhibition de la synthèse de la chitine constituant de la paroi des dermatophytes.

L'huile essentielle d'*Inula viscosa* révèle un pouvoir antifongique puissant contre les moisissures [43]. Elle peut être exploitée dans l'industrie agro-alimentaire afin d'augmenter la durée de vie d'un grand nombre de produits alimentaires en particulier les corps gras [32].

Des recherches antérieures menées par l'Université de Valence en 1999, ont cherché à établir une base solide pour l'utilisation documentée d'*Inula viscosa* comme un remède à diverses maladies de peau. Les flavonoïdes (rhamnocitrin , 7-O-methylaromadendrin, 3-O-acetylpadmatin , inuviscolide, l'acide Ilicic, et un digalactosyl-diacylglycérol, inugalactolipid A , ont été isolés à partir de l'extrait de CH₂Cl₂, identifié et caractérisé comme les propriétés anti-inflammatoires topiques d'*Inula viscosa* [44]. Tous ces composés se sont avérés efficaces contre 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate induite l'œdème de l'oreille chez les souris.

9. Conclusion :

Les travaux antérieurs ont montré la richesse des *Inules* en métabolites secondaires tel que les huiles essentielles, lactones Sesquiterpéniques et les flavonoïdes.

C'est ainsi, que toute cette richesse dans l'usage thérapeutique traditionnel de la plante, nous a encouragé à étudier l'espèce algérienne *Inula viscosa* afin d'en extraire les principes actifs naturels.

Bibliographie:

- [1] J.L.Guignard, *Abrégé Botanique*. 9^{ème}Ed.203-204, (1994).
- [2] H.Gaussen, H.F.Leroy, *Précis de Botanique* (végétaux supérieurs). 2^{ème} Ed, p 426, (1982).
- [3] F.Quezel, S.Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vol 1-2, Ed. CNRS, Paris France, (1962-1963).
- [4] J.B.Harborne, T.Swain, *Perspectives in Phytochemistry*, Academic Press, London, New York, (1969).
- [5] R.R.Paris, H.Moyse, *Précis de matière Médicale*. Tome III, Paris, p 397, (1971).
- [6] P.Paulian, Guide pour l'Etude de quelque plantes Tropicales. Ed. Gauthier-Villards, Paris, (1967).
- [7] Gérard Chenuet et al, la santé par les plantes, Vidal -Sélection du reader's digest, *Phytothérapie*. p 320, (2007).
- [8] T.Okuda, (Ed), *Encyclopedia of Natural Medicine*. Vol 1, Hirokawa,Tokyo, p 64, (1986).
- [9] Jiangsu New Medical College (Ed), Dictionary of Traditional Chinese Medicines, Shanghai Scientific and Technological Publishing House, Shanghai, p. 80, (1986).
- [10] Jiangsu, New Medical College. In Dictionary of Traditional Chinese Material Medica; *People's Press, Shanghai*. Vol 2. p 2216, (1977).
- [11] W.Blaschek, R.Hainsel, K.Keller, J.Reichling, H.Rimpler, G.H.Schneider, *Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, vol 2: Drogen A-K. New York: Springer Publishing. p 526, (1998).
- [12] T.Konishi, Y.Shimada, T.Nagao, H.Okabe, T.Konoshima, *Biol Pharm Bull*. 25:1370, (2002).
- [13] Jiangsu College of New Medicine. A Comprehensive Dictionary of the Traditional Chinese Medicines. Suzhou Jiangsu, China, p 627–629, (1977).
- [14] T.J.Tsarong, Tibetan Medicinal Plants. Tibetan Medical Publications. India, (1994).
- [15] J.Tardio, H.Pascual, R.Morales, Alimento silvestres de Madrid, La Libreria. Madrid,(2002).
- [16] L.Villar, J.M.Palacin, C.Calvo, D.Gomez, G.Monserrat, Plantas medicinales del Pirineo aragonés y demás tierras oscenses, CSIC, Diputación de Huesca. Huesca, (1987).
- [17] Enam.A.Khalil, Fatma.U.Afifi, Maysa.Al-hussaini, *Journal of Ethnopharmacology*.109 104–112, (2007).
- [18] R.Fauron, R.Moati, Y.Donadieu, Guide pratique de phytothérapie. Ed. Maloine, p 811, (1983).
- [19] P.Fournier, Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. Le chevalier. Tome 1, p176-178, (1947).
- [20] S.Benayache, F.Banayache, H.Dendoughi, M.Jay, Les Flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome 25, n°4, p170-176, (1991).
- [21] C.Susplugas, G.Balansard, J.Julien, *Herba Hung*. 19:19, (1980).

- [22] NissimKrispsil, *Herbes Pouch* (traduit de l'original hébreu), Jérusalem: Kana éditeurs, (1982).
- [23] S.Bicha, Etude de l'effet de la pollution du sol par les métaux lourds sur l'accumulation des métabolites secondaires de l'exsudat chloroforme de *Inula viscosa* (compositae). Thèse de magister, Université de Constantine, (2003).
- [24] N-J.Yu, Y-M.zhao, Y-Z.zhang, Y-F.Li, Japonicins A and B from the flowers of *Inula Japonica*, *Journal of Asian Natural Products Research*. 8:5, 385-390, (2006).
- [25] J.Bruneton, *pharmacognosie, phytochimie des plants médicinales, techniques et documentation*, Lavoisier, Paris 268, (1993).
- [26] L.Shouxin, L.He, Y.Weijing, Z.Li, B.Naisheng, H.Chi-Tang, Design, synthesis, and anti-tumoractivity of (2-O-alkyloxime-3-phenyl) -propionyl-1- O-acetylbritannilactone esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.13, 2783–2789, (2005).
- [27] H.Dendougui, (1989), Thèse de magister, Université de Constantine, *plant. Med. phytother.* 25 : (4) 170-176, (1991).
- [28] S.Minkue M'Eny, étude chimique des substances extractibles d'Okoumé ; thèse M.Sc ; *Univ. Laval*, (2000).
- [29] S.Oksöz, Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Plantamed*, 29(4): 343-345, (1976).
- [30] Bohlman.F, Czerson.H, S.Schöneweiss, New constituents of *Inula viscosa* Ait. *chem.Ber.* 110, 1330-1334, (1977).
- [31] A.Ahmed, H.Mohamed.Abou El-Hamd, T.Olga, P.Alexandra, E.Hassan.Mohamed, A. Mohamed.El-Maghraby, Z.Klaus-Peter, Terpenes from *Inula verbascifolia*. *Phytochemistry*. 62: 1191–1194, (2003).
- [32] D.Boumaza, Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : *Inule visqueuse*, *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran, thèse de magister, (2011).
- [33] M.H.AbuZarga, E.M.Hamed, S.S.Sabri, W.Voelter, K.P.Zeller, New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa*. *J.Nat.Prod.*61:798-800, (1998).
- [34] M.H.Abu Zarga, S.S.Sabri, E.M.Hamed, M.A.Khanfar, K.P.Zeller, Atta-Ur-Rahman. A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, Vol 17, N°2, pp 99-102, (2002).
- [35] Z.Yaniv, A.Dafni, J.Friedman, D.Palevitch, Plants used for treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*. 19: 145-15, (1987).
- [36] S.Máñez, V.Hernández, R.-M.Giner, J.Ríos, R.Mariadel Carmen, *Fitoterapia*. 78: 329, (2007).
- [37] N.A.Zeggwagh, M.L.Ouahidi, A.Lemhadri, M.Eddouks, *Journal of Ethnopharmacology*. p108-223, (2006).

- [38] L.Lauro, C.Rolih, Bollettino Societa Italiana Biological Sperimentable. 66: 829, (1990).
- [39] C.Alarcon De La Lastra, A.Lopez, and V.Motilva, Planta Medica. 59: 497, (1993).
- [40] C.Cafarchia, N.De Laurentis, M.A.Milillo, V.Losacco, V.Puccini, *Parassitologia*. 44: 153, (2002).
- [41] K.Adam, A.Sivropoulou, S.Kokkini, T.Lanaras, M.Arsenakis, *J.Agric, Food Chem*, Vol 46: 1739-1745, (1998).
- [42] F.Bssaibis, N.Gmira, M.Meziane.Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 3, N°1. pp 44-55, (2009).
- [43] S.X.Franco-Mican, J.Castro, M.Campos, Observation du complexe parasite de l'inule visqueuse en Espagne et ses méthodes de propagation, *Le Nouvel Olivier*. n°66, nov-déc, (2008).
- [44] S.Manez, MC.Recio, I.Gil, C.Gomez, RM.Giner, PG.Waterman, JL.Rios, Un analogue glycosyl de diacylglycérol et d'autres constituants anti-inflammatoires d'viscosa Inula, *J Nat Prod*.62 (4), 601-604, Avril (1999).

Chapitre III

Etude phytochimique de la plante Inula viscosa

1. Matériel et méthodes :

1.1. Préparation du matériel végétal :

Le présent travail porte sur une Astéracées appelée *Inula viscosa* récoltée en octobre dans la région d'Oran (Université d'Oran). Les feuilles et tiges (parties aériennes) sont séchées à l'ombre à température ambiante, puis broyées à l'aide d'un broyeur. La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité jusqu'à leur utilisation.

1.2. Méthodes :

1.2.1. Extraction :

L'extraction a été faite dans six solvants organiques à polarité croissante, du moins polaires au plus polaires : l'hexane, le dichlorométhane, chloroforme, méthanol, acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol à l'aide d'un appareil de type Soxhlet [1].

100g de poudre végétale sont introduits dans une cartouche filtrante adaptée à la dimension de l'appareillage. Le ballon contient 1000 ml du solvant et quelques grains de pierre ponce (afin d'éviter l'ébullition du solvant).

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme de la figure 1.

On obtient les masses suivantes :

- ✓ **Filtrat₄** (Extrait méthanol) : $m = 2.223\text{g}$ (2.22%)
- ✓ **Filtrat₅** (Extrait acétate d'éthyle) : $m = 0.952\text{g}$ (0.95%)
- ✓ **Filtrat₆** (Extrait *n*-Butanol) : $m = 0.202\text{g}$ (0.20%)

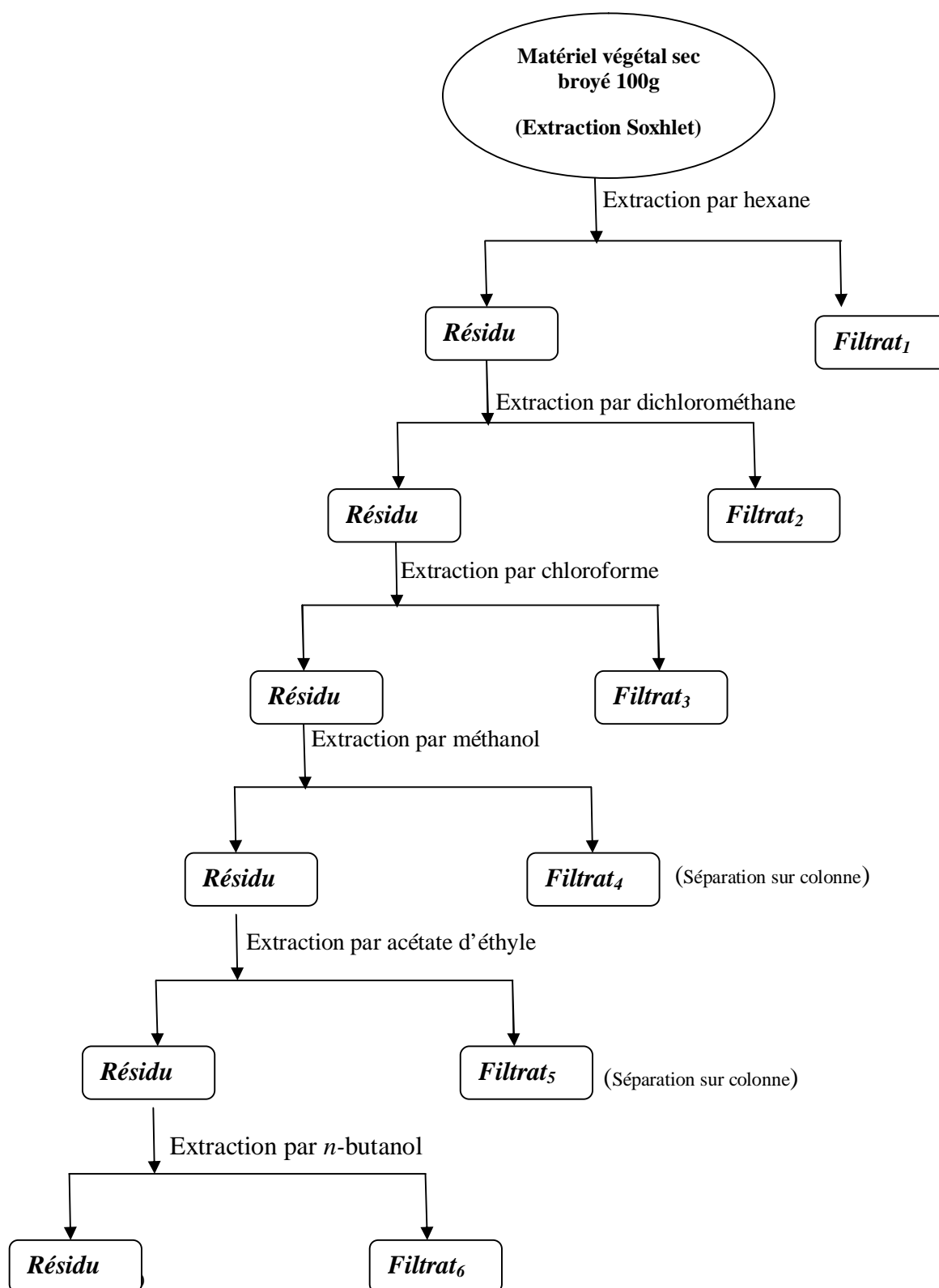


Figure1: Extraction des flavonoïdes par appareil Soxhlet.

1.2.2. Concentration :

Les six extraits obtenus par le Soxhlet sont ensuite concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après dessiccation, les résidus sont pesés puis récupérés avec un minimum de solvant (chloroforme).

Les trois solvants : l'hexane, dichlorométhane et chloroforme ont permis d'extraire les impuretés, les molécules apolaires et surtout la chlorophylle qui risque de compliquer les épreuves chromatographiques.

2. Séparation des flavonoïdes :

2.2. Chromatographie sur couche mince :

Nous avons abouti à plusieurs systèmes à fin d'avoir une bonne séparation, quatre systèmes de solvants sont testés :

1. Acétone /eau (10-10)
2. *n*-butanol /Acétone /eau (40-10-50)
3. chloroforme /méthanol/ eau (90-10-5)
4. Acétate d'éthyle/Acide acétique/eau (80-10-10)

Nous avons retenu celui ayant donné les meilleures séparations; le troisième chloroforme/méthanol/eau (90/10/5).

➤ Visualisation des taches

La visualisation se fait :

-à l'œil nu.

-avec une lampe UV (254 et 365nm)

-avec réactif spécifique de coloration (ex : Réaction à la cyanidine)

Relation : structure-fluorescence

Les spots flavonoïdes représentant les constituants séparés sont caractérisés par leur fluorescence (couleur) et leur facteur de rétention (R_f). L'examen sous UV fournit des informations importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. Il porte des indications particulières concernant les substitutions.

Les relations entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV sont résumées dans le tableau N°1 [2] :

Tableau N°1 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.

Spots colorés	Type des flavonoïdes
Violet-brunâtre	5-OH Flavone 3-OH 5, 6, 7 ou 5, 7, 8 tri-OH
Violet	flavone ou flavone 5-OH flavonol sans 5-OH flavonol avec 3-OH
Jaune	flavonol avec ou sans 5-OH
Orange brillant	isoflavone
Jaune verdâtre	aurones
Vert	chalcones

2.3. Chromatographie sur colonne :

Caractérisation des Flavonoïdes :

La détection de la présence des flavonoïdes dans les extraits obtenus d'*Inula viscosa* a été faite par la réaction à la cyanidine. Pour chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de l'HCl et quelques fragments de magnésium. Le test est positif lorsqu'on obtient la couleur rouge (de type flavone ou flavonol).

Une étude préliminaire phytochimiques à la recherche des flavonoïdes a été effectuée sur les différents filtrats séparés (filtrat 1 à 6). Le tableau suivant montre le résultat de la recherche.

Tableau N°2 : résultat de la recherche des flavonoïdes (Réaction à la cyanidine)

Filtrats	Recherche des Flavonoïdes
Filtrat1	-
Filtrat2	-
Filtrat3	-
Filtrat4	++++
Filtrat5	++++
Filtrat6	Plante est épuisée

Les extraits contenant la chlorophylle, les acides gras, les lipides ...etc, sont difficile à séparer c'est le cas de les trois premiers extraits. L'extrait méthanolique et celui d'acétate d'éthyle (Filtrat4 et Filtrat5) ont subi une séparation sur colonne.

Etude du filtrat 4 :

L'extrait méthanolique a été fractionné sur colonne en gel de silice. L'éluant utilisé est en première étape de séparation est le chloroforme ensuite le méthanol, puis le *n*-butanol et enfin l'acétate d'éthyle. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau N°3.

Tableau N° 3: Regroupement des fractions issues de la colonne n°1de l'extrait méthanolique d'*Inula viscosa*.

Fractions	Nom de la fraction	Aspect	Masse (g)
1 - 11	F1	liquide	0.155
12 - 23	F2	huileux	0.353
24 - 45	F3	huileux	0.195
46 -116	F4L	liquide	1.546
	F4S	solide	0.122
117-129	F5	liquide	0.206

Le suivi des fractions est effectué par CCM. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

Les deux premières fractions **F1** et **F2** sont bien séparés, la purification de ces deux fractions ont subi par une deuxième colonne.

Tableau N° 4 : Regroupement des sous-fractions issues de la colonne n°2 du produit **F1**.

Sous-fractions	Nom de la fraction	Masse (g)
1 - 12	F11 (vert)	0.015
13 - 28	F12 (vert)	0.047
29 - 59	F13 (jaune)	0.036
60 - fin	F14 (blanc)	0.010

Tableau N° 5 : Regroupement des sous-fractions issues de la colonne n°3 du produit **F2**.

Sous-fractions	Nom de la fraction	Masse (g)
1 - 6	F21 (vert)	0.122
7 - 16	F22 (jaune)	0.043
17 - 40	F23 (jaune)	0.126
41 - fin	F24 (jaune)	0.010

Etude du filtrat 5 :

L'extrait acétate d'éthyle a été fractionné sur colonne en gel de silice. L'éluant utilisé est en première étape de séparation est le chloroforme ensuite le méthanol, puis le n-butanol et enfin l'acétate d'éthyle. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau N°6.

Tableau N° 6: Regroupement des fractions issues de la colonne n°4 de l'extrait acétate d'éthyle d'*Inula viscosa*.

Fractions	Nom de la fraction	Aspect	Masse (g)
1 - 10	A1	huileux vert	0.197
11 - 19	A2	huileux vert	0.173
20 - fin	A3	solide jaune	0.242

Toutes les fractions collectées sont évaporées et récupérées par le chloroforme. Les fractions sont analysés à l'aide des méthodes chromatographiques (voir annexe spectre HPLC) et spectroscopiques.

3. Résultats et discussion :

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker Avance 200 (200,13 MHz ou 50,32 MHz) au Service de RMN de la faculté de Pharmacie, Marseille. Les solvants utilisés sont le méthanol deutéré (CD₃OD) et le chloroforme deutéré (CDCl₃). Les déplacements chimiques, exprimés en δ (ppm), ont été mesurés par rapport au signal du solvant pris comme référence et rapportés au signal du TMS, les constantes de couplage (J) sont données en Hertz.

Etude phytochimique de l'extrait méthanolique et acétate d'éthyle à la recherche de type de flavonoïdes en utilisant la réaction de la cyanidine montre la présence des flavonoïdes de type flavonols (coloration rouge).

Ultraviolet-visible :

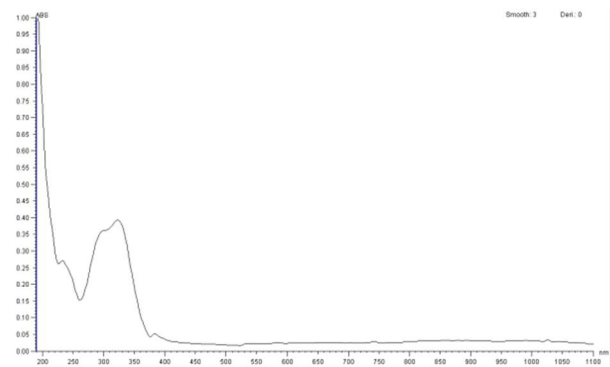
En générale, les flavonoïdes présentent deux bandes maximales et caractéristiques [3]:

Bande I : Appartient au noyau B, elle varie de 300 à 400 nm

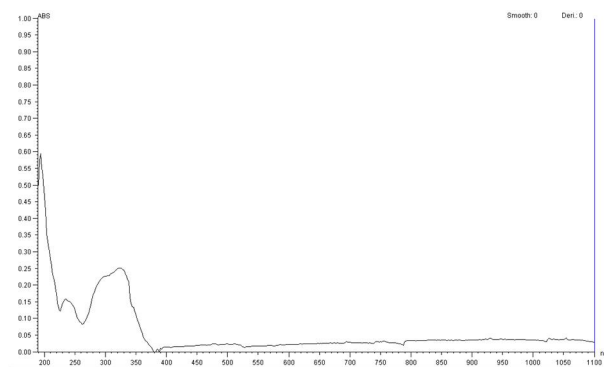
Bande II : Appartient au noyau A, elle varie de 240 à 285 nm

Tableau N° 7 : Les données de la série spectrale UV de produits **F24** et **A3**.

Composé	Bande I	Bande II	Autre bande	Commentaire
F24	324	236	194	Présence des deux bandes des flavonoïdes
A3	324	234	/	Présence des deux bandes des flavonoïdes



A3



F24

IR :

- L'examen du spectre IR (**voir annexe 2**) nous donne une première série d'information concernant la structure du composé **F24** et **A3**.

Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence de fonction ou des groupements spécifiques tels que :

La fonction —C—O— de l'aglycone :

- La valeur de l'absorption du C=O dépend des effets dus aux groupes voisins, de la conjugaison et des liaisons H. Pour notre aglycone la conjugaison avec une double liaison C=C diminue la force de la liaison C=O et de la liaison C=C. Il y a effet bathochrome pour les deux absorptions $\nu_{\text{C=O}}$ et $\nu_{\text{C=C}}$ ($\nu_{\text{C=C}}$ à 1645.95 cm^{-1} et $\nu_{\text{C=O}}$ à 1740.44 cm^{-1}). La bande large à 3418.21 cm^{-1} confirme la présence d'une fonction OH.

RMN :

Le spectre RMN- ^1H des composés flavoniques donne des informations sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm et il permet de connaître :

- La position et le nombre des protons portés par le flavonoïde.
- Le nombre de substituant méthoxyles portés par le squelette flavonique.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

Les protons du cycle (C) :

- Les protons des substituant méthoxyles : Un ou plusieurs méthoxyles donnent des singuliers entre 3.8 et 4.5 ppm.

Les protons des sucres :

- Le déplacement chimique du proton anomérique des sucres est lié à la position et la nature de la liaison entre le sucre et l'aglycone qui peut exister en deux genres : O-glycosyl ou C-glycosyl.

Produit F24 :

L'examen de spectre RMN ^1H de produit **F24** (figure 2, tableau N°8) montre:

- Quatre signaux sous forme d'un doublet à $\delta = 6,20$ ppm, $\delta = 6.44$ ppm, $\delta = 6.54$ ppm et $\delta = 6.92$ ppm attribuables respectivement aux protons H-2', H-6', H-3' et H-5'.
- Deux autres signaux sous forme de doublet à $\delta = 7.38$ ppm et $\delta = 7.40$ ppm attribuable respectivement aux protons H-6 et H-8.
- Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 7.37$ ppm attribuable au proton H-3.
- Un multiplet entre 4-4.5 montre la présence de deux sucres dont les protons anomériques H-1' et H-1'' ont observé sous forme de doublet respectivement à 5.34 ppm et 5.32 ppm.
- L'emplacement du glucose ne peut se faire que sur le OH du carbone N° 5 ou 7.

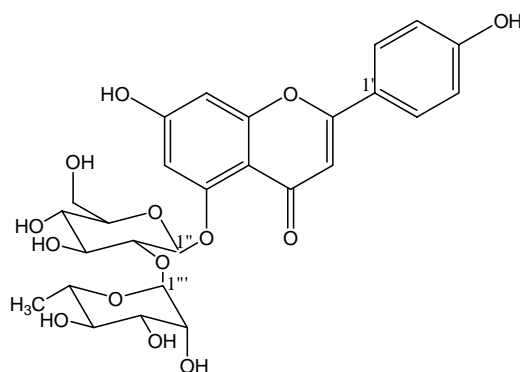
L'intensité lumineuse de l'ensemble des produits isolé indique la présence d'un OH libre en 4', la présence d'une nouvelle bande entre 296-330 nm confirme la présence d'un OH libre en 7.

Le spectre RMN du proton, enregistré dans CDCl_3 montre les signaux caractéristiques regroupés dans le tableau N°8.

Tableau N° 8: les déplacements chimiques et multiplicité observés du produit **F24** séparé

Atome	H. δ (ppm)	multiplicité
H2'	6.20	d
H6'	6.44	d
H3'	6.54	d
H5'	6.92	d
H3	7.37	S
H6	7.38	d
H8	7.40	d
H6''	1.29	d
H1''	5.34	d
H1'''	5.32	d
Protons du sucre	4 – 4.5	m

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ^1H et la série spectrale UV et IR nous mènent à l'identifié le composé **F24** comme apigénine 5 rhamnoglucoside.



Apigénine-5-rhamnoglucoside

Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$

Masse molaire : 578 g/mole

Pf : 347,5 °C

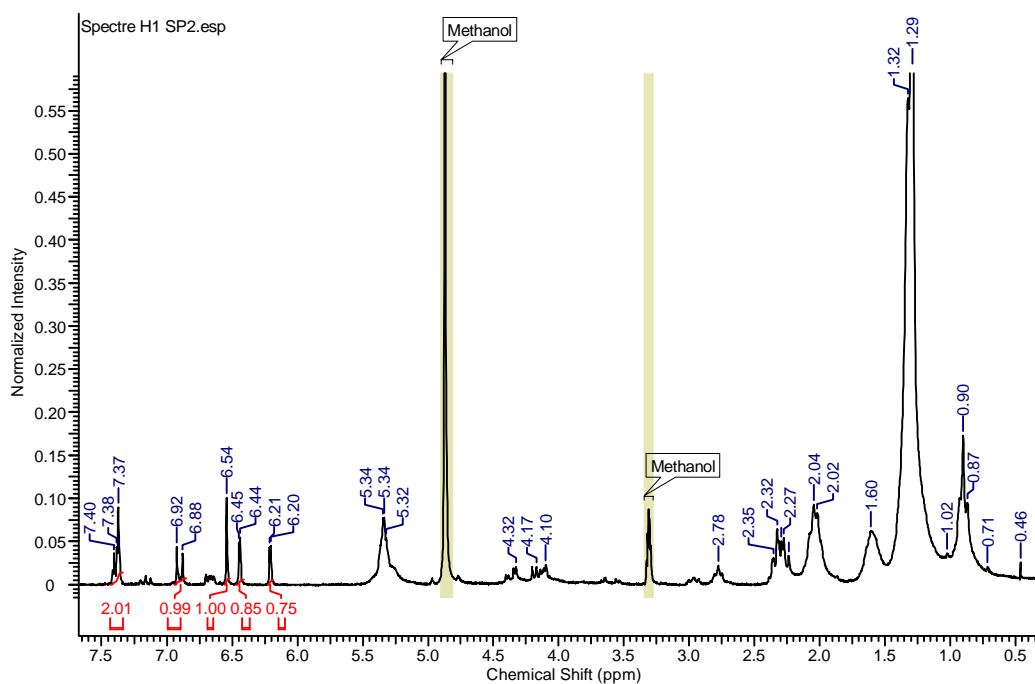


Figure 2 : Spectre de RMN ^1H de l'apigénine séparé.

Produit A3:

L'examen des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de produit **A3** (figure 3 et 4, tableau N° 9 et 10) montre:

- Deux signaux sous forme de doublet à $\delta = 6.2$ ppm et $\delta = 6.4$ ppm attribuable respectivement aux protons H-6 et H-8.
- Deux autres signaux sous forme de doublet à $\delta = 7.7$ ppm et $\delta = 7.1$ ppm attribuable respectivement aux protons H-2' et H-5'.
- Par ailleurs deux signaux sous forme de doublet de doublet qui apparaît à $\delta = 7.6$ ppm est attribuable à H-6'.
- Un multiplet entre 3-4 montre la présence d'un sucre dont le proton anomérique est observé à $\delta = 5.25$ ppm.

Le spectre RMN du proton, enregistré dans CDCl_3 montre les signaux caractéristiques regroupés dans le tableau N°9.

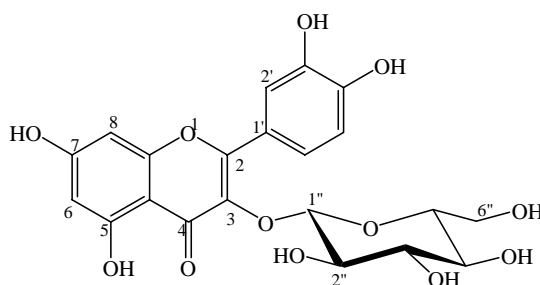
Tableau N° 9 : les déplacements chimiques et multiplicité observés du produit **A3** séparé

Atome	δ (ppm)	multiplicité
H6	6.2 (J=1.4)	d
H8	6.4 (J=1.4)	d
H2'	7.7 (J=2.1)	d
H5'	7.1 (J=8.5)	d
H6'	7.6 (J=8.5 ; 2.1)	dd
H1''	5.25 (J=2.3)	d
Protons de sucre	3-4	m

Le spectre RMN ^{13}C enregistré dans CDCl_3 montre la présence de 21 carbones.

- L'analyse de RMN ^{13}C de composé **A3** dans la région 62.70-104.51 montre la présence de six signaux correspond aux carbones du sucre. Les déplacements chimiques sont regroupés dans le tableau N°10:

Identification du produit **A3** a été réalisé de la même manière. Ce dernier correspond à l'isoquercétine.



Isoquercétine

Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

Masse molaire : 464 g/mole

Tableau N° 10: les déplacements chimiques et multiplicité observés (RMN- ^{13}C) du produit **A3** séparée.

Atome	δ (ppm)
C2	159.11
C3	135.76
C4	179.59
C5	163.16
C6	100.20
C7	166.67
C8	94.97
C9	158.56
C10	136.53
C1'	123.22
C2'	117.68
C3'	146.03
C4'	150.02
C5'	116.15
C6'	123.33
C1''	104.51
C2''	75.87
C3''	78.37
C4''	71.36
C5''	78.53
C6''	62.70

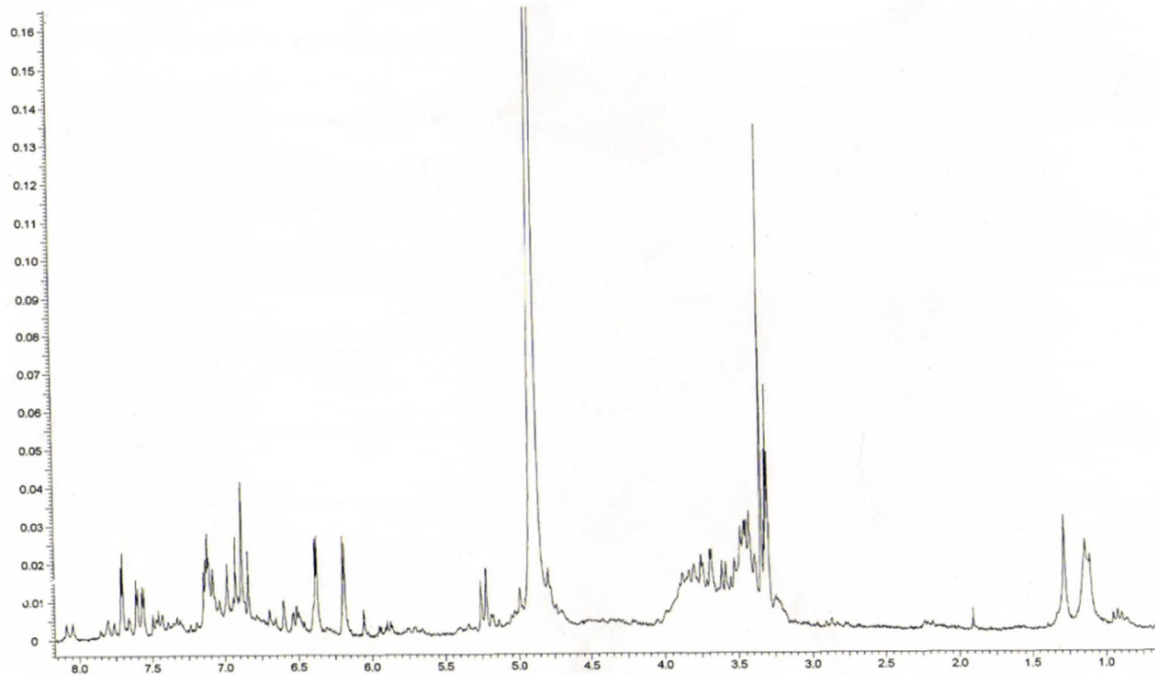


Figure 3 : Spectre de RMN ^1H d'isoquercétine séparée (A3).

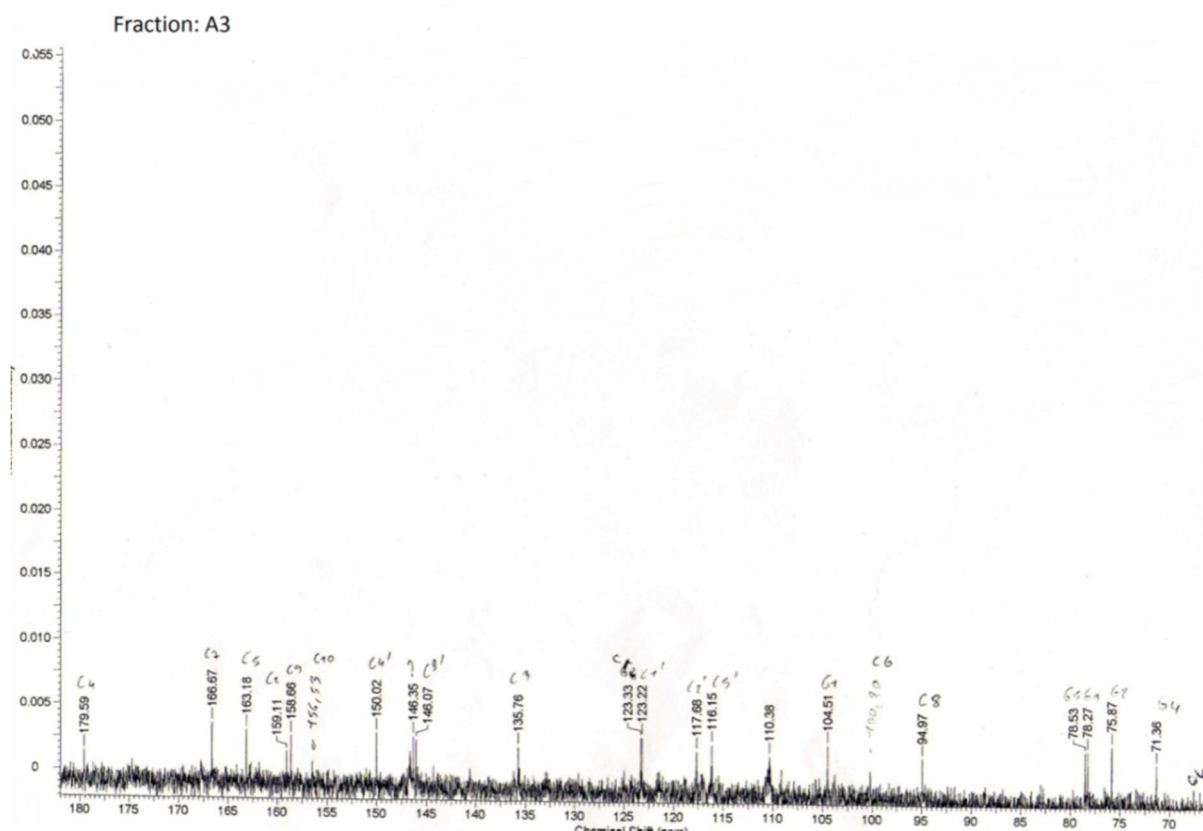


Figure 4 : Spectre de ^{13}C d'isoquercétine séparée (A3) (CDCl_3 ; 200 MHz).

Analyse de la Fraction F13 :

- La purification de ces composés (Fraction **F13** c'est avérée très difficile, voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.
- L'analyse phytochimique montre la présence d'un acide gras non purifié (réactif avec le Bleu solide B).

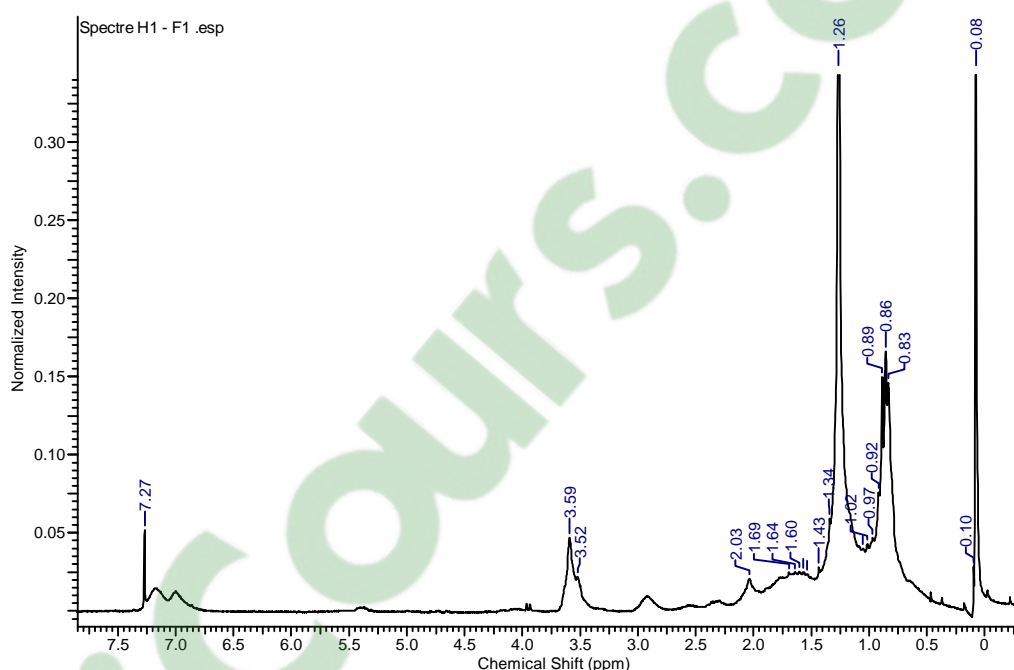


Figure 5: Spectre de ^1H acide gras (**F13**) séparé (CDCl_3 ; 200 MHz).

4. Conclusion :

Un screening phytochimique de la plante nous a permis de connaître les composés majoritaires de type flavonoïdes.

L'extraction de ces derniers par la méthode croissante de polarité des solvants (hexane_ acétate d'éthyle) nous a permis une bonne séparation des produits de type flavonols et flavones.

En effet, apégenine et l'isoquercétine font partie des polyphénols [4, 5], retrouvées pour la première fois dans cette espèce, elles sont très proche de la quercétine et possèdent des propriétés antioxydantes [6, 7], anti-inflammatoire [8] et vasoprotectrices [9].

Bibliographie:

- [1] M.D.Luque de Castro, F.Priego-Capote, Soxhlet extraction: past and present panacea. *J. Chromatography*. 1217: 2383-2389, (2009).
- [2] T.J.mabry, R.Makham k, M.B.Thomas, The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag, *New York. Heidelberg. Berlin*. p 12, 35-230, (1970).
- [3] Darina Ronanova, Anna Vachalkova. UV spectrometric and DC polarographic studies on apigenin and luteolin. *Arch Pharm Res*. Vol 22, N°22, 173-178, (1999).
- [4] Tayfun ERS OZ, U.S_ebnem HARPUT, _Iclal SARACO_GLU, _IhsanC_ALIS, Phenolic Compounds from *Scutellaria pontica*. *Turk J Chem*. 26: 581-588, (2002).
- [5] LI.We, Rong-Ji DAI, Y.Yu-Hong, LI.Liang, WU.Chong-Ming, Antihyperglycemic Effect of *Cephalotaxus sinensis* Leaves and GLUT-4 Translocation Facilitating Activity of Its Flavonoid Constituents.*Biol. Pharm. Bull*. 30(6) 1123-1129, (2007).
- [6] Effect of flavonoids and cynarine from cynaracardunculus L. on lipoxxygenase activity. Bezakova L. *Actafacultatis pharmaceuticae universitatis comeniana Tomus LIV*, (2007).
- [7] Jessica Tabart, Claire Kevers, Joël Pincemail, Jean-Olivier Defraigne, Jacques Dommes, Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests , *Food Chemistry*, vol. 113, p. 1226-1233, (2009).
- [8] I.B.F.Calou, D.I.M.Sousa, G.M.D.Cunha, G.A.D.Brito, E.R.Silveira, V.S.Rao, F.A.Santos, Topically applied diterpenoids from *Egletesviscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone. *Biol. Pharm. Bull*. 31: 1511-1516, (2008).
- [9] Hanrui Zhang, Cuihua Zhang, Vasoprotection by Dietary Supplements and Exercise: Role of TNF α Signaling. *Experimental Diabetes Research* Volume 2012, Article ID 972679. p6, (2012).

Chapitre IV

***Mise en évidence de l'activité
biologique de l'extrait
hydro-alcoolique***

1. Introduction :

Les micro-organismes (champignons, bactéries, parasites, virus...) se trouvent partout dans l'environnement.

Les champignons (moisissures, levures,...) regroupent de très nombreux genres et espèces. Certains sont utiles pour les industries pharmaceutiques (antibiotiques, œstrogènes, anabolisants, vitamines, enzymes, acides organiques) et les industries de fermentations (panification, bière).

D'autres champignons sont nuisibles. Ils altèrent les denrées, polluent l'atmosphère, engendrent des maladies chez l'homme (mycoses, allergies, intoxications,...) et chez les végétaux (mildiou, fusariose, verticilliose,...).

Les bactéries jouent également un rôle très important dans l'environnement (intervention dans les cycles biogéochimiques). Certains sont pathogènes pour l'homme (tuberculose, fièvre typhoïdes,...), les animaux (brucellose mammites,...) et les plantes (gales, flétrissement, tumeurs sur les racines,...) [1].

D'autres ont un effet bénéfiques sur l'organisme humain comme ceux qui vivent dans l'intestin et contribuent à la digestion (flore intestinale).

Différents moyens de lutte sont utilisés pour combattre les micro-organismes nuisibles :

- ✦ En agriculture [2] on utilise des méthodes culturales (rotation de culture, amendements minéraux et organiques,...), des méthodes biologiques (lutte biologique) et des méthodes chimiques (fongicides).
- ✦ En médecine, on utilise les antibiotiques.
- ✦ En pharmacopée, de nombreuses substances bioactives obtenues par voie d'extraction sont utilisées [3].

Selon la littérature, les flavonoïdes sont connus pour leurs nombreuses et diverses propriétés anti-inflammatoire [4], antimicrobienne [5], anticancéreuses [6], antioxydantes [7] et autres.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'extrait méthanol / eau de la plante *Inula viscosa* en la testant *in vitro* vis-à-vis des espèces bactérienne et fongiques.

2. Matériels et méthodes :

2. 1. Matériel végétale :

2. 1. 1. Extraction par la méthode de lixiviation:

Extraction successives par dichlorométhane, méthanol et méthanol/eau (50/50) :

Poids de plante broyée pour les tests : 10g de plante + 100 ml de solvant. On utilise une colonne en verre de 2.5 cm environ.

Extraction par le CH₂Cl₂ :

On mélange la plante broyée avec le CH₂Cl₂ (maximum 100 ml) dans un bécher puis on introduit dans une colonne et laisser macérer une nuit dans le CH₂Cl₂. La plante doit être recouverte de solvant. Le lendemain on fait lixiviation et on ajoute de solvant neuf en tête de colonne. (On récupère 100 ml de lixiviat).

L'extraction a été faite de la même manière en utilisant le méthanol puis le méthanol/eau. On fait l'évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif et on laisse sécher le marc sous la Sorbonne. Pour la troisième extraction la phase aqueuse doit être lyophilisée.

1.2.2. Préparation du lyophilisat:

Elle se réalise dans le **lyophilisateur** Alpha 2-4 LD plus marque CHRIST, le principe consiste à éliminer sous vide toute fraction aqueuse contenue dans le produit. L'opération s'est déroulée comme suit :

Les extraits obtenues sous forme aqueuses sont congelées à -40°C, ensuite déposées dans le lyophilisateur pendant 24 à 36 heures jusqu'à l'obtention du produit final appelé «lyophilisat».

Obtention en fin d'opération de **3 lyophilisats**.

- **Lyophilisat 1** : extrait de dichlorométhane.
- **Lyophilisat 2** : extrait de méthanol.
- **Lyophilisat 3** : extrait de mélange méthanol/eau.

2.1.3. Préparation des extraits :

On s'intéresse à l'activité antimicrobienne du **lyophilisat 3**. Après lyophilisation on obtient une poudre jaune. On introduit 500 mg de cette poudre dans un mélange MeOH/Eau (10/7) ml.

Des dilutions ont été réalisées à partir de la solution mère (500 mg), ce qui donne trois concentrations : C₁, C₂ et C₃ (29, 15 et 7) mg/ml.

2.2. Origine des souches microbiennes testées :

2.2.1. Souches bactériennes :

Nous avons testé l'activité antibactérienne des trois concentrations de l'extrait méthanol/eau d'*Inula viscosa* avec quatre souches bactériennes :

- | | |
|---------------------------------|-----------|
| ➤ <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC6538 |
| ➤ <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC6633 |
| ➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC14028 |
| ➤ <i>Escherichia coli</i> | ATCC25922 |

Les caractéristiques de différentes espèces bactériennes sont résumées dans le tableau N°1.

Tableau1 : Principales caractéristiques des souches bactérienne testées [8].

Famille	Genres et espèces	Origine	Gram	Formes et mobilité	Caractères biologiques	Habitat	Pouvoir pathogène
Micrococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	+	Cocci Immobile	Aérobie facultatif catalase+, oxydase-coagulase+	Peau et muqueuses.	Infection pyogènes graves.
Enterobacteriaceae	<i>Echerichia coli</i>	ATCC25922	-	Bacille Mobile	Aérobie facultatif oxydase-, lactose+, indole+	Tube digestif.	Infections urinaires et des gastro-entérites infantiles.
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginasa</i>	ATCC14028	-	Bacille Mobile	Aérobie strict oxydase+	Commensale des téguments et des muqueuses del'homme et des animaux.	Infections nosocomiales.
Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	+	Bacille Mobile	Aéro-anaérobie facultatif oxydase-, eatalase+	Sol, poussière, eau, air et plantes.	/

2.2.2. Souche fongique :

Candida albicans ATCC10231, est une espèce de levure. La caractéristique de cette espèce est résumée dans le tableau N°2.

Tableau N°2 : Principales caractéristiques de la souche fongique testée.

Genres et espèces	Origine	Morphologie	Habitat	Pouvoir pathogène	Références
Levure					
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	Levures ovoïdes ou rondes (3 à 6µm sur 6 à 10µm) à bourgeonnement multilatérale. Colonie blanche, crémeuse, lisse.	Tube digestif de l'homme, des mammifères et des oiseaux.	Candidoses superficielles.	[9, 10, 11]

ATCC: American Type Culture Collection.

3. Milieu de culture:

Nous avons utilisé le milieu de culture gélose de Muller Hilton pour contrôler la pureté des souches.

4. Conservation des cultures microbiennes :

Les quatre souches bactériennes sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 4°C. Elles sont repiquées sur un nouveau milieu tous les trois mois.

L'espèce levuriforme est conservée dans des tubes de PDA gélosé incliné ou bien sur milieu Sabourand, à une température de 4°C.

5. Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la plante *Inula viscosa* :

5.1. Préparation du pré cultures microbiennes :

Les souches bactériennes conservées ont étéensemencées dans des tubes à essai contenant du bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24 heures, afin de stimuler leur développement. Après croissance bactérienne, ces souches ont été repiquées sur une gélose nutritive coulée en boîte de Pétri puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

5.2. Teste d'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne des trois concentrations de l'extrait méthanol/eau d'*Inula viscosa* est testée sur quatre souches bactériennes et une souche fongique par la méthode de diffusion en milieu gélosé [12].

6. Recherche de l'activité antibactérienne :

➤ Préparation de la suspension bactérienne

Chaque espèce bactérienne estensemencée sur une gélose nutritive en boîte de Pétri. Après 24h d'incubation à 37°C, 3 à 4 colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 10 ml de bouillon nutritif.

➤ Ensemencement du milieu de culture en boîtes de Pétri et dépôt des disques

9 ml de gélose Muller Hilton en surfusion à 45°C sont coulés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. L'épaisseur du milieu doit être de 4 mm car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un résultat erroné.

1ml d'inoculum bactérien standardisé (10^6 UFC/ml) est aseptiquement déposé et étalé sur la surface du milieu de Muller Hilton à l'aide d'un étaloir. Un mouvement circulaire en forme de huit permet de bien répartir la suspension bactérienne sur toute la surface du milieu. Le liquide en excès est aspiré avec une pipette Pasteur stérile [12].

A l'aide d'une pince stérile, 3 disques de 6mm de diamètre, imprégnés de 10 µl des trois concentrations de l'extrait méthanol/eau d'*Inula viscosa* à tester, sont aseptiquement déposé sur la surface du milieuensemencé (03 boîtes pour chaque espèce bactérienne).

Les disques déposés dans les cultures témoins (03 boîtes) sont imprégnés uniquement du solvant (méthanol). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h [12].

7. Résultats et discussions :

Après 24 heures d'incubation, l'effet des flavonoïdes est estimé par la présence ou l'absence de la croissance microbienne. L'estimation de la prolifération du germe se fait par rapport au témoin.

Les résultats des tests antimicrobiens sont regroupés dans le tableau 3 et illustrés par les fig1, fig2, fig3, fig4 et fig5.

Tableau N° 3 : Estimation de la croissance bactérienne et de celle de *Candida albicans* en présence de différentes concentrations.

Concentrations Souches	C ₁ =29 (mg/ml)	C ₂ =15 (mg/ml)	C ₃ =07 (mg/ml)	Témoin
	<i>Staphylococcus aureus</i>	16mm	9mm	6mm
<i>Echerichia coli</i>	6mm	6mm	6mm	6mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6mm	6mm	6mm	6mm
<i>Bacillus subtilis</i>	15mm	12mm	11mm	6mm
<i>Candida albicans</i>	10mm	11mm	14mm	6mm

A partir de tableau N° 3 et figures 1, 2, 3, 4 et 5 on constate que l'extrait méthanol/eau de la plante *Inula viscosa* ont une activité inhibitrice sur la *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*.

Le pouvoir antimicrobien le plus élevé de l'extrait méthanol/eau est observé pour *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 16 mm. Par contre pour *Bacillus subtilis* il est de 15 mm et pour *Candida albicans* 14 mm.

Aucune zone d'inhibition n'est observée pour *Echerichia coli* et *Pseudomonas aeruginasa*. Chez les bactéries à gram négatif, nous n'avons remarqué aucune zone d'inhibition, cela veut dire qu'il n'y a pas d'effet antibactérien. Ces bactéries sont résistantes aux substances végétales contenues dans la plante *Inula viscosa*.

Le témoin (méthanol) n'a exercé aucune activité inhibitrice, les colonies se développent normalement en sa présence.

8. Conclusion :

D'après les résultats obtenus, on remarque que les substances naturelles de la plante *Inula viscosa* sont de bons agents antimicrobiens, on peut en déduire donc, que l'extrait méthanol /eau de cette plante agisse comme un antibiotique.

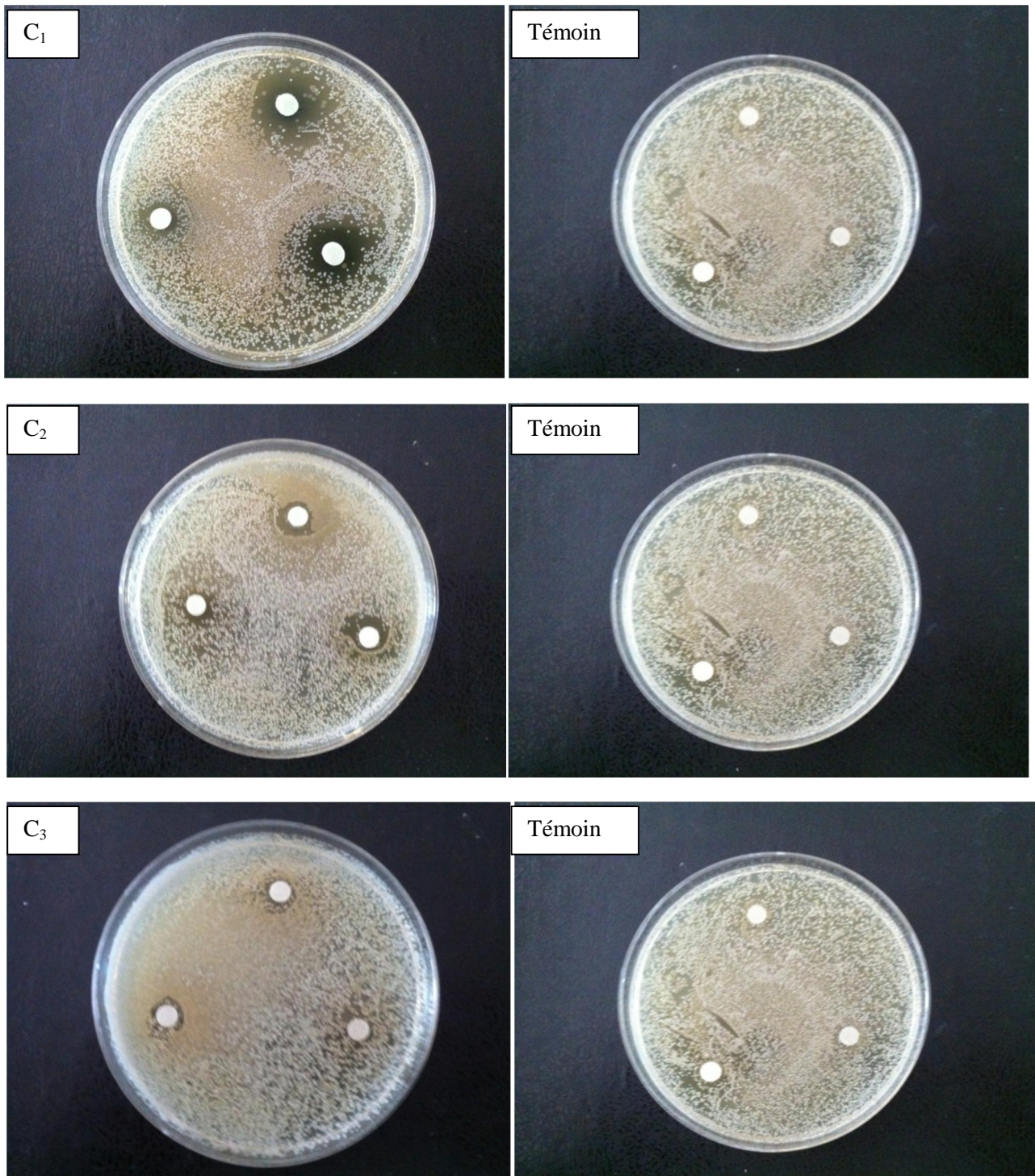


Fig.1 : Inhibition de la croissance microbienne de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 en présence des concentrations C₁, C₂ et C₃, après 24h d'incubation à 37°C.

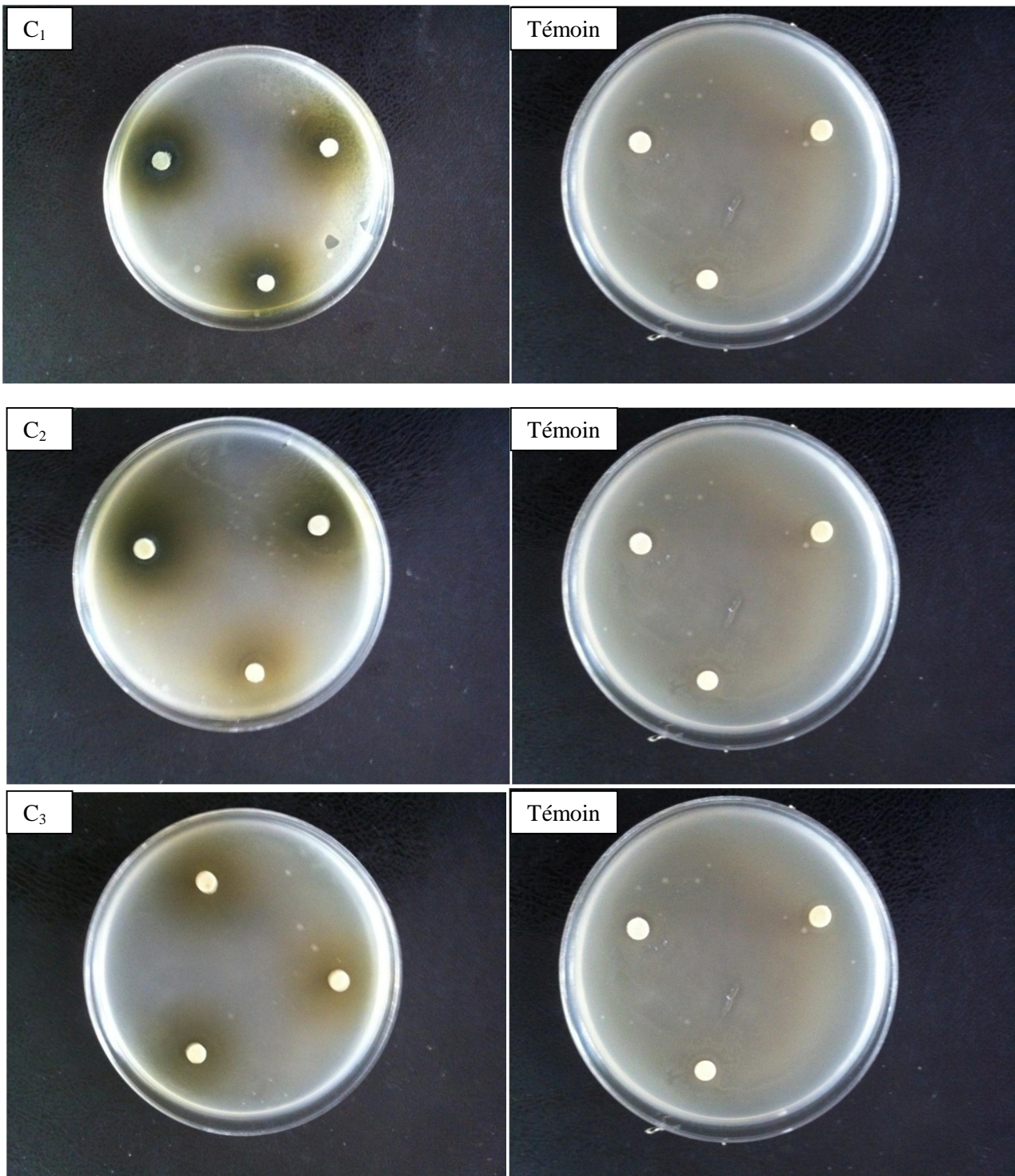


Fig.2 : Inhibition de la croissance microbienne d'*Echerichia coli* ATCC25922 en présence des concentrations C₁, C₂ et C₃, après 24h d'incubation à 37°C.

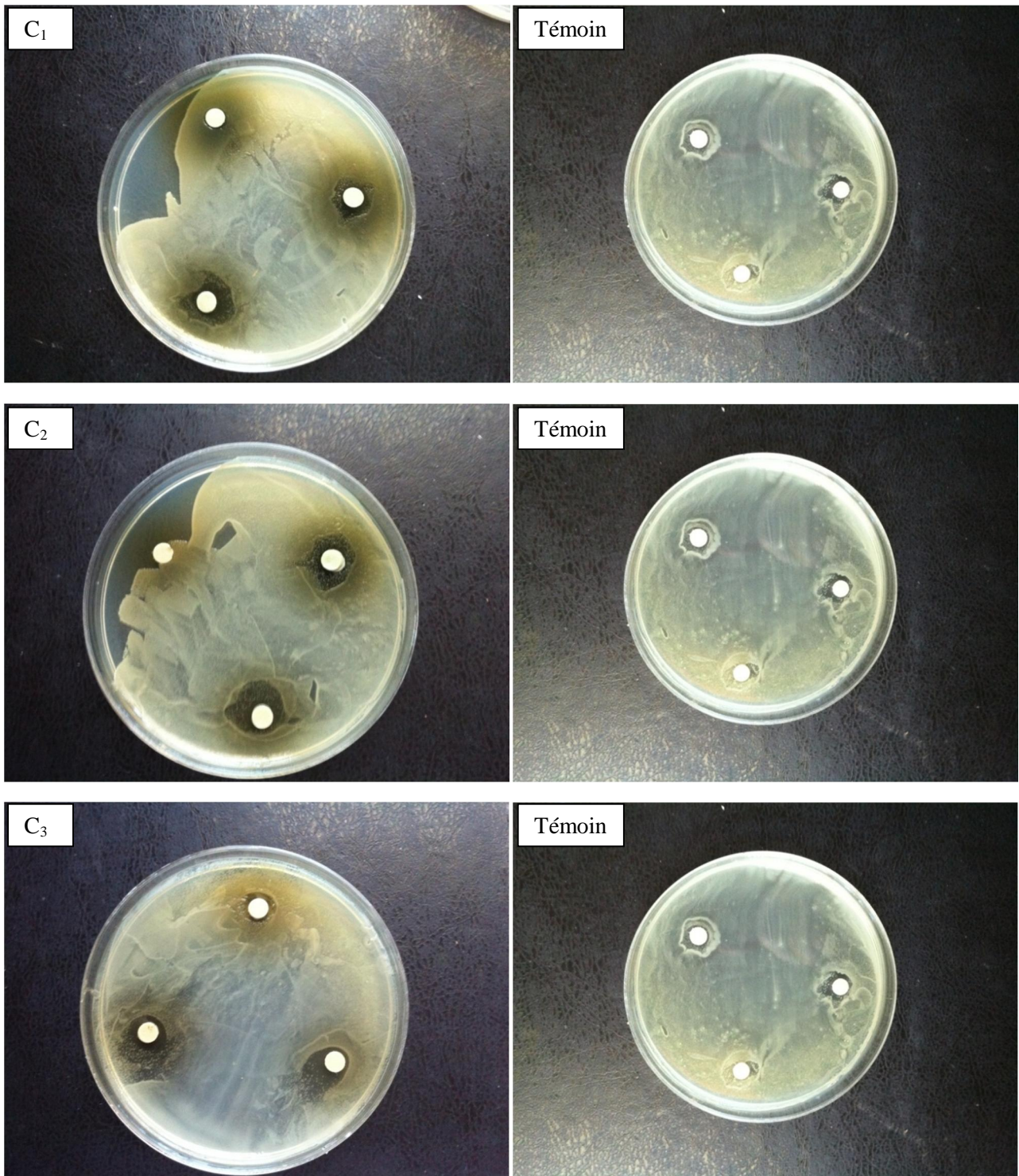


Fig.3 : Inhibition de la croissance microbienne de *Candida albicans* ATCC10231 en présence des concentrations C₁, C₂ et C₃, après 24h d'incubation à 37°C.

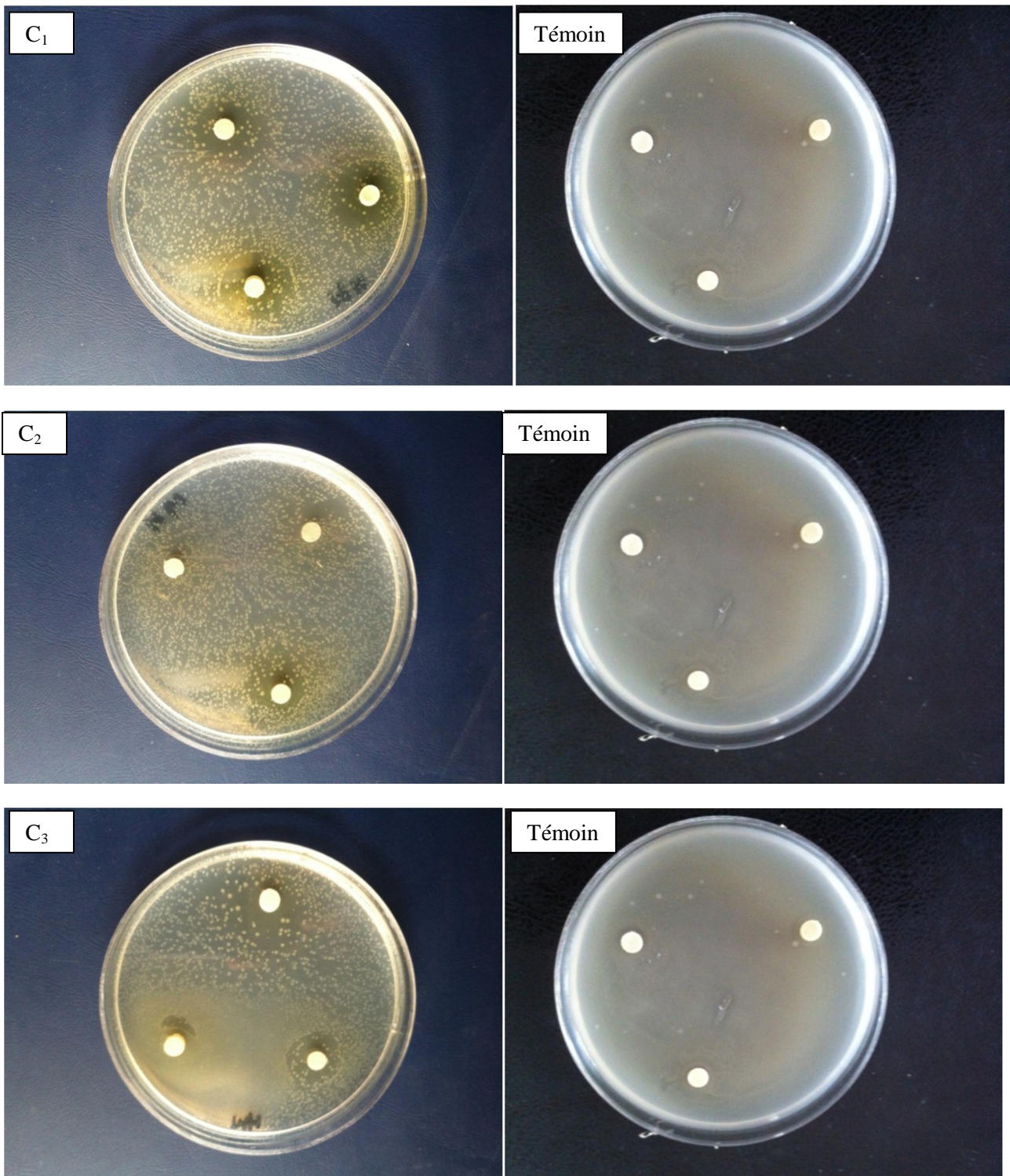


Fig.4 : Inhibition de la croissance microbienne de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC14028 en présence des concentrations C₁, C₂ et C₃, après 24h d'incubation à 37°C.

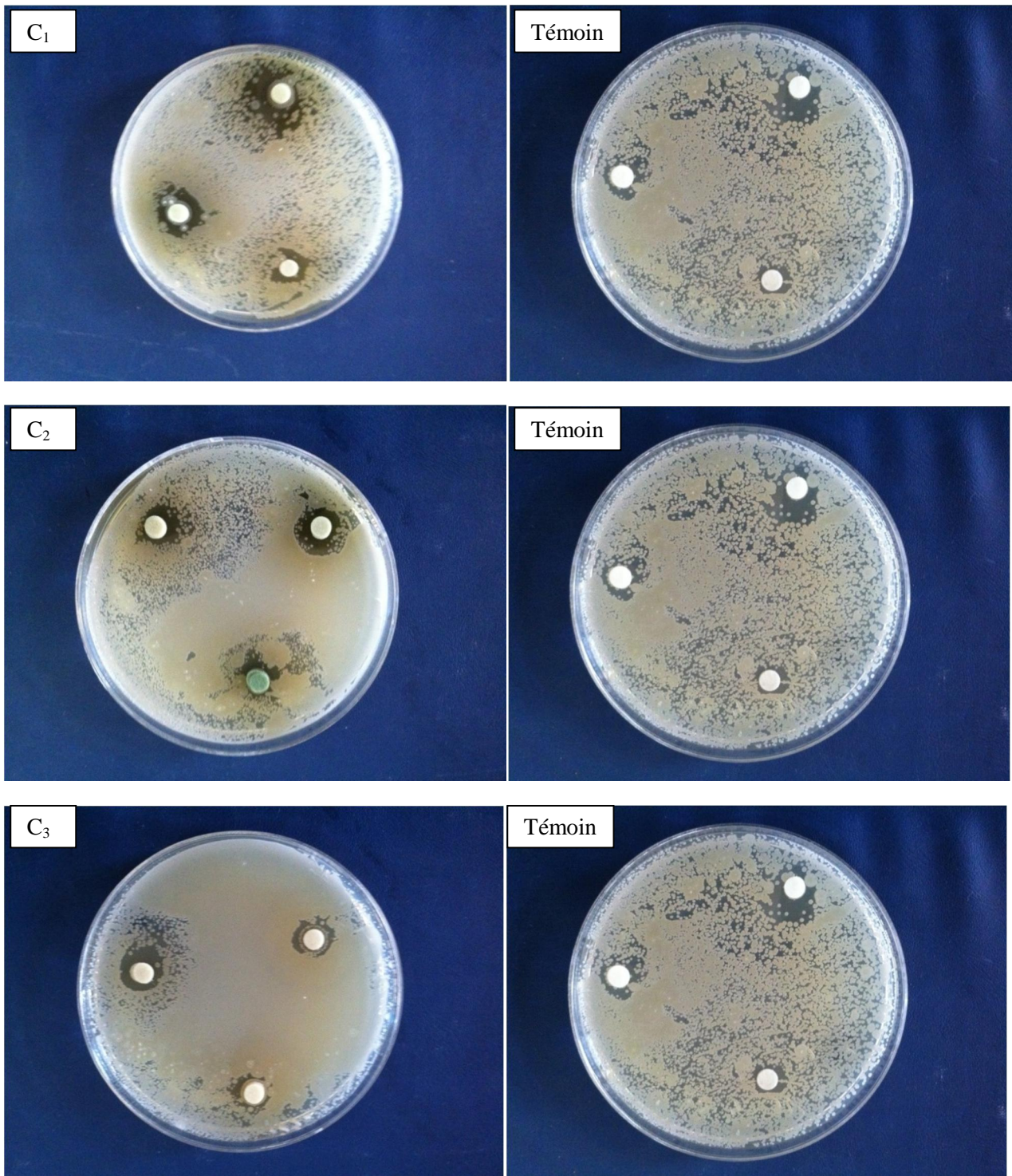


Fig.5 : Inhibition de la croissance microbienne de *Bacillus subtilis* ATCC6633 en présence des concentrations C₁, C₂ et C₃, après 24h d'incubation à 37°C.

Bibliographie :

- [1] N.Kambouche, Screening phytochimique, extraction et évaluation des effets antioxydants et antidiabétiques des saponines, alcaloïdes et huiles essentielles de trois agro ressources algériennes, *Thèse de doctorat*. p53, (2009).
- [2] M.Besri, *J.phytopathology*. p7-8, (1975).
- [3] P.Leroux. Lamene, R.Fritz, *pestic.Sci*.36. p261, (1992).
- [4] Sánchez de Medina F, Vera B, Gálvez J, et al. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci* 70 (26): 3097-108, (2002).
- [5] M.Benziane Maatalah, N.KamboucheBouzidi, S.Bellahouel, B.Merah, Z.Fortas, R.Soulimani, S.Saidi, A.Derdour, Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research Vol. 3(3)*. p 54-57, (2012).
- [6] P.Knekt, R.arvinen, R.Seppanen, et al, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*. 146: 223-30, (1997).
- [7] P.Montoro, A.Braca, C.Pizza, N. De Tommasi, Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species, *Food Chem*. 92: 349-55, (2005).
- [8] J.L.Fauchère, J.L.Avril, *Bactériologie générale et médicale*. Ed. Ellipses, Paris. p 365, (2002).
- [9] H. Koenig, *Gide de Mycologie Médicale*. Ed. Ellipses, Paris. p 284, (1995).
- [10] R. Grillot, *Les mycoses humaines : Démarche diagnostique*. Ed. Scientifiques et médicales Elsevier, Paris. p 392, (1996).
- [11] V.Guillaume, *Mycologie*.Ed, de boeck, Bruxelles. p55, (2006).
- [12] S.Neggaz, *Analyse chromatographiques et spectroscopiques des composés antimicrobiens d'une espèce de terfez : Tirmaniapinoyi (Maire)*.Thèse de magister, (2010).

Conclusion Générale

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'étude des propriétés antimicrobienne a concerné la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran.

L'isolement des composés et leurs purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison des méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation des techniques spectroscopiques, telle que RMH, IR et UV.

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

Nous avons identifié deux flavonoïdes : l'apigénine et l'isoquercétine respectivement dans l'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle, et un acide gras dans la fraction méthanolique de la partie aérienne d'*Inula viscosa*.

L'étude phytochimique d'*Inula viscosa* a donné d'autres composés chimiques. La purification de ces composés c'est avérée très difficile, voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.

L'effet antimicrobien de l'extrait hydro-alcoolique de la plante *Inula viscosa* est mis en évidence par la méthode des disques, en présence de quatre espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, et une espèce fongique *Candida albicans*. Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-alcoolique lyophilisé d'*Inula viscosa* possède un effet inhibiteur sur les souches à gram (+) (genre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et sur la levure *Candida albicans*. *Inula viscosa* n'a aucun effet inhibiteur sur les souches à gram (-) (genre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

A la lumière de tous ces résultats, nous pouvons dire que les effets antibactériens et antifongiques obtenus seraient dus à l'action des flavonoïdes existants au niveau des parties aériennes de notre plante.

Des travaux récents ont montré que l'apigénine et l'isoquercétine isolés de notre plante pourrait permettre de réduire le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées qui suivent un traitement hormonal de substitution^{1,2}.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Déterminer des nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.
- Evaluer les seuils de toxicité et d'efficacité en précisant la DE 50 et la DL 50.
- Confirmer par des tests «*in vivo*» l'intérêt thérapeutique.
- Enfin, proposer d'éventuelles préparations galéniques à usage externe (industries pharmaceutiques).

¹ B.Mafuvadze, I.Benakanakere, F.Lopez, C.L.Besch-Williford, M.Ellersieck, S.M.Hyder, Apigenin prevents development of medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. *Cancer Prev Res (Phila)*. Apr 19, (2011).

² Hanrui Zhang, Cuihua Zhang, Vasoprotection by Dietary Supplements and Exercise: Role of TNF α Signaling. *Experimental Diabetes Research* Volume 2012, Article ID 972679. p6, (2012).

ClicCourses.com

Annexes

Annexe 1: Composition des milieux de culture

1. Milieux pour les cultures bactériennes :

➤ **Gélose nutritive**

Extrait de viande 1g

Extrait de levure 2g

Peptone 5g

Chlorure de sodium 5g

Agar-agar 15g

Eau distillée 1L

pH 7.4

➤ **Gélose Muller-Hilton**

Infusion de viande de bœuf 5

Peptone de caséine 17.5g

Amidon 1.5g

Agar-agar 17g

Eau distillée 1L

pH 7.4

2. Milieux pour les cultures fongiques :

➤ **Gélose Sabouraud**

Peptone 10g

Glucose 20g

Agar-agar 20g

Eau distillée 1L

pH 6

► Milieu potato Dextrose Agar (PDA)

Glucose 20g

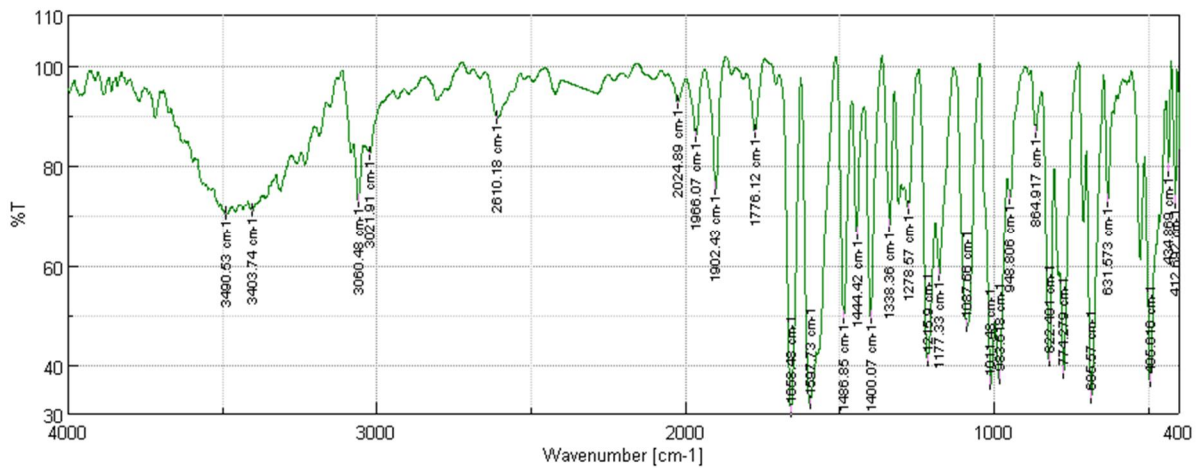
Agar-agar 20g

Extrait de pomme de terre 1L

pH 5.6

Annexe 2 : Les spectres IR.

A3:

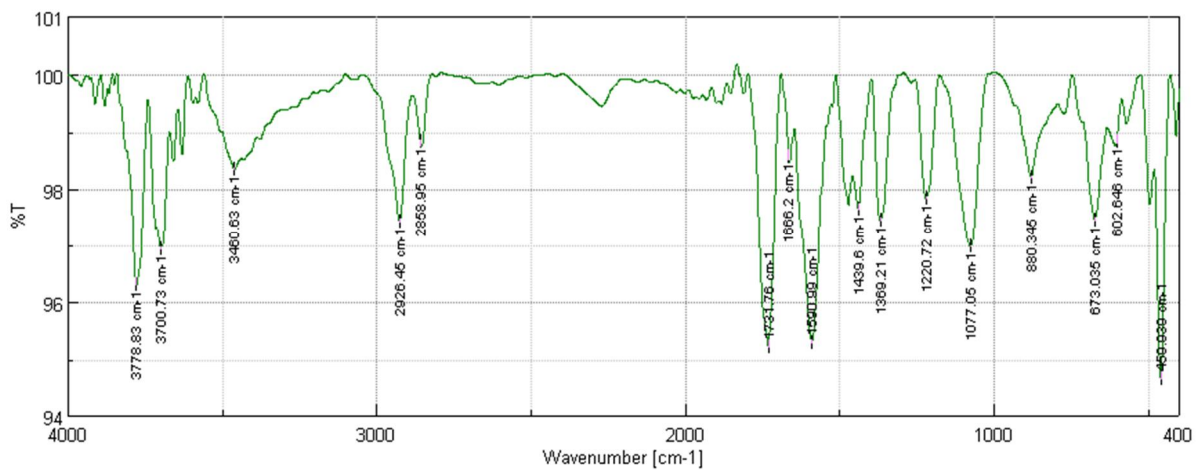


F24 :



Clicours.COM

F13 :



Annexe 3 : spectre HPLC.

F3 :

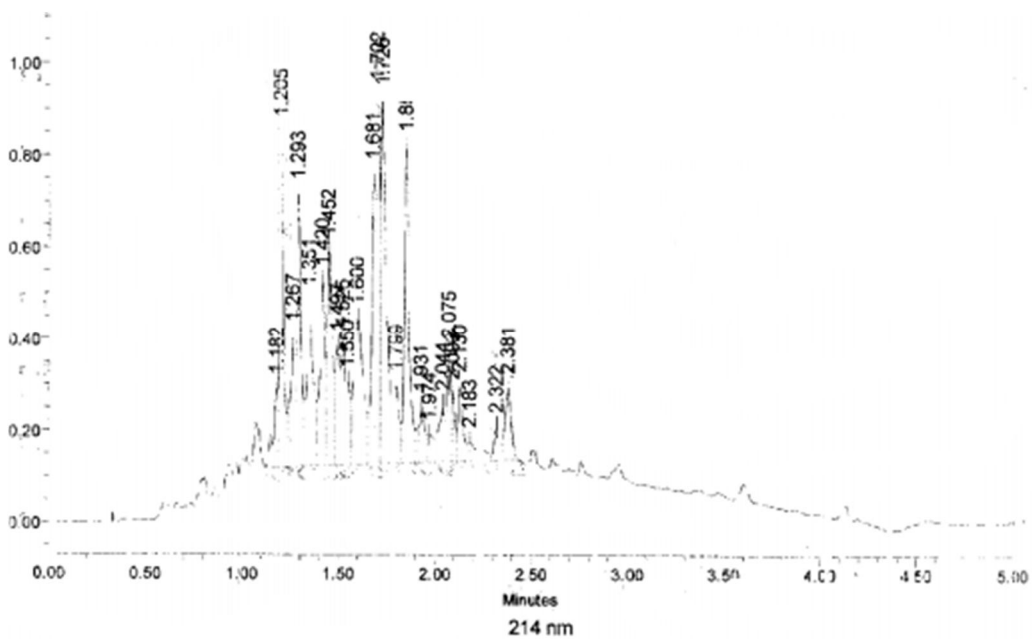


Tableau de resultats

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area
1		1.182	174806	1.22
2		1.205	1043044	7.30
3		1.267	433508	3.38
4		1.293	350988	5.95
5		1.351	308143	5.65
6		1.420	717338	5.02
7		1.452	876785	6.13
8		1.497	429986	3.01
9		1.525	416991	2.92
10		1.550	252457	1.77

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area
11		1.600	1116080	7.81
12		1.681	753654	5.27
13		1.702	1169373	8.18
14		1.726	1578356	11.05
15		1.799	393652	2.75
16		1.851	1157342	8.10
17		1.931	239912	1.68
18		1.974	117950	0.83
19		2.044	30272	2.12
20		2.075	331373	2.32

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area
21		2.093	151611	1.05
22		2.130	296936	2.03
23		2.183	125540	0.83
24		2.322	152493	1.07
25		2.381	350764	2.45

F2 :

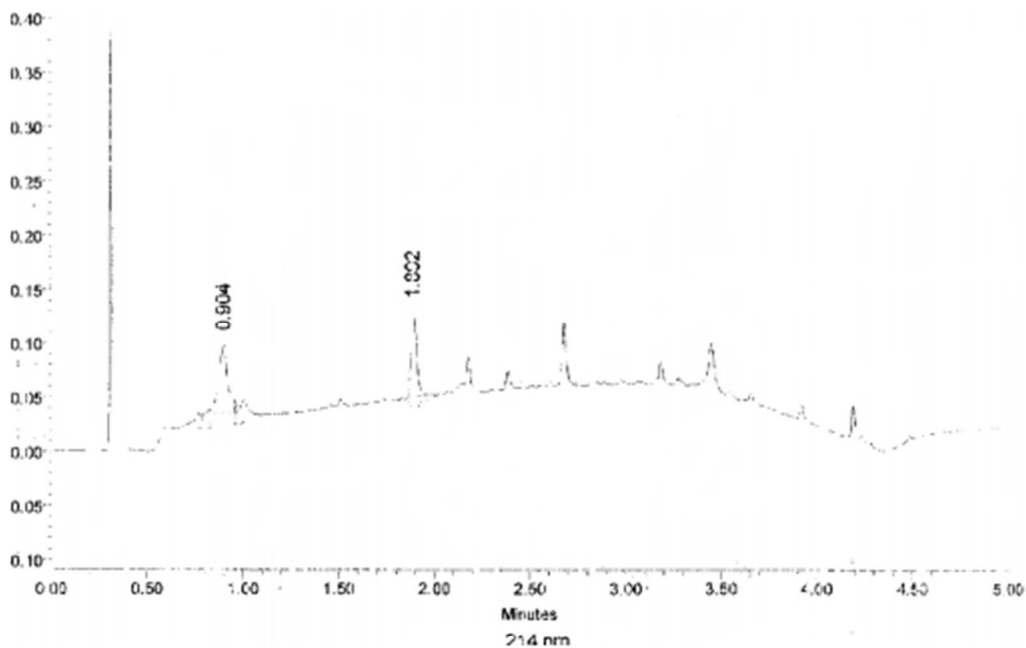


Tableau de resultats

	Name	RT	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area
1		0.904	213442	57.16
2		1.892	163728	42.84

Résumé

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'étude des propriétés antimicrobienne a concerné la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran.

L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que UV, IR et RMN, qui ont permis d'isoler deux flavonoïdes : l'apigénine et l'isoquercétine respectivement dans l'extrait méthanolique et l'acétate d'éthyle et un acide gras.

L'étude phytochimique d'*Inula viscosa* a donné d'autres composés chimiques. La purification de ces composés c'est avérée très difficile, voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.

L'effet antimicrobien de l'extrait hydro-alcoolique lyophilisé de la plante *Inula viscosa* est mis en évidence par la méthode des disques, en présence de quatre espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, et une espèce fongique *Candida albicans*.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-alcoolique lyophilisé d'*Inula viscosa* possède un effet inhibiteur sur les souches à gram (+) (genre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et sur la levure *Candida albicans*. *Inula viscosa* n'a aucun effet inhibiteur sur les souches à gram (-) (genre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Mots-clés : Composées / *Inula viscosa* / Flavonoïde / Phytochimie / Extraction / Lyophilisation / Activité antimicrobienne / Gram (+) / Gram (-) / bactéricide.

Résumé

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'étude des propriétés antimicrobienne a concerné la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran.

L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que UV, IR et RMN, qui ont permis d'isoler deux flavonoïdes : l'apigénine et l'isoquercétine respectivement dans l'extrait méthanolique et l'acétate d'éthyle et un acide gras.

L'étude phytochimique d'*Inula viscosa* a donné d'autres composés chimiques. La purification de ces composés c'est avérée très difficile, voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.

L'effet antimicrobien de l'extrait hydro-alcoolique lyophilisé de la plante *Inula viscosa* est mis en évidence par la méthode des disques, en présence de quatre espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, et une espèce fongique *Candida albicans*.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-alcoolique lyophilisé d'*Inula viscosa* possède un effet inhibiteur sur les souches à gram (+) (genre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et sur la levure *Candida albicans*. *Inula viscosa* n'a aucun effet inhibiteur sur les souches à gram (-) (genre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Mots-clés :

Composées; *Inula viscosa*; Flavonoïde; Phytochimie; Extraction; Lyophilisation; Activité antimicrobienne; Gram (+); Gram (-); Bactéricide.