



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

CENTRE UNIVERSITAIRE LARBI BENMHIDI OUM EL-BOUAGHI

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



N° d'ordre :
Série :

Mémoire
Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister
En Chimie
Option
CHIMIE PHARMACEUTIQUE

~~CH. 118~~ CH. 118 - 121
Thème

Etude phytochimique et biologique de l'extrait
butanolique et des huiles essentielles des graines et des
tiges de l'espèce endémique du chebka du m'zab
pituranthos scoparius
(Apiacea)

Par : Benmekhbi Lotfi

Président : Prof. K. Lamara Centre Univ. d'Oum el Bouaghi
Rapporteur : Prof. Z. Kabouche Univ. Mentouri Constantine
Examineur : M.C. M. Benkhaled Université de Batna
Examineur : Prof. B. Ait-Kaki CHU Constantine

06/A
30

Soutenu le 28-09-2004.



Dédicace :

À ma mère.

À mon père .

À mes sœurs.

À Souad .

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques LOST de l'université de Constantine sous la direction scientifique du professeur Zahia KABOUCHE. Que ce mémoire soit l'occasion de lui exprimer mes plus vifs remerciements ainsi que ma profonde gratitude pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son groupe de recherche et son soutien moral, sa grande disponibilité, son écoute ainsi que ses conseils précieux qui ont m'orienté dans ce parcours.

J'adresse mes vifs remerciement à Mr. Kaddour LAMARA, professeur au Centre Universitaire D'Oum El Bouaghi, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie également Mr. Brahim AIT KAKI, professeur au CHUC, d'avoir accepté de juger ce travail, comme je tiens à remercier le docteur Mohamed BENKHALED d'avoir accepté d'examiner ce travail et aussi de nous avoir présenté une aide bibliographique précieuse.

Je remercie également Melle Wassila TOUAFEK, Mr. Ahmed KABOUCHE et Mr. Amar NACER pour leurs conseils fructueux.

Je remercie mes collègues Nedjoua, Assia et Souheila et spécialement Naima Boutaghane pour son aide précieuse.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus profonds à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin : Sabrina, Ouahiba, Imed, Amel, Hanène, Souad, Sihem, Firouz, Mounira, Walim, Tarek, Ameer et spécialement Malek, Raouf, Saber, Oualid, Moustafa et mon cousin Mohamed.

Enfin, Je remercie tous ceux qui ont participé à ce travail par un soutien moral, matériel et scientifique.

LISTE DES ABREVIATIONS, ET DES SYMBOLES

Ac	Acétylacétone
AlCl ₃	Chlorure d'aluminium
ATB	Antibiotique
ATCC	American Culture Type Collection
°C	Degré Celsius.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
F	Fraction.
h	Heure
H ₃ BO ₃	Acide borique.
HCl	Acide chlorhydrique
Hz	Hertz
J	Constante de couplage.
λ	Longueur d'onde
MeOH	Méthanol
μm	Micromètre.
NaOAc	Acétate de sodium.
NaOH	Soude
ppm	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire.
UV	Ultra-Violet.
HE	Huile essentielle

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
Bibliographie.....	3
CHAPITRE I : Généralités sur le genre <i>Pituranthos</i>.	
I. Aspect botanique	4
I. 1- Taxonomie.....	4
I.1.1 Caractère général du genre <i>Pituranthos</i>	5
I.1.2 L'espèce <i>Pituranthos scoparius</i>	5
I.1.3 Localisation.....	6
I.2 Utilisations traditionnelles.....	6
I.3 Aspect chimique.....	7
I.3.1 Données chimiotaaxonomiques.....	7
I.3.2 Travaux antérieurs sur le genre <i>Pituranthos</i>	7
Bibliographie	13
CHAPITRE II : Les flavonoides	
II.1 Définition et structure.....	15
II.1.1 Biosynthèse des flavonoides.....	17
II.2 Activité biologique des flavonoides et leurs effets sur la santé.....	20
II.2.2 Les flavonoides et la santé.....	20
II.2.2 L'activité anti-microbienne des flavonoides.....	22
II.2.3 Autres activités des flavonoides.....	23
II. 3 Méthodes d'analyse des flavonoides.....	24
II.3.1 Méthodes d'analyses structurales des flavonoides.....	24
II.3.1.1 Le Rf.....	24
II.3.1.2 La fluorescence sous la lumière de Wood.....	26
II.3.1.3 Spectrométrie UV-visible.....	27
II.3.1.3.1 Spectre UV-visible dans le méthanol.....	28
II.3.1.3.2 Addition des réactifs.....	29
II.3.1.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	33
II.3.2 Conclusion.....	33
Bibliographie.....	34

CHAPITRE III : Description des travaux d'extraction phytochimique et extraction des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i>	
III.A	Etude phytochimique du <i>Pituranthos scoparius</i> 39
III.A.1	Etude botanique..... 39
III.A.1.1	Place dans la systématique..... 39
III.A.1.1	Description botanique..... 40
III.A.2	Matériel végétal et extraction 41
III.A.2.1	Matériel végétal..... 41
III.A.2.2	Extraction..... 41
III.A.3	Contrôle chromatographique..... 43
III.A.4	Méthodes de séparation des produits de l'extrait butanolique..... 45
III.A.4.1	Chromatographie sur colonne de polyamide..... 45
III.A.4.2	Chromatographie sur couche mince 47
III.A.4.3	Analyse chromatographique des fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ 48
III.A.5	Résultats et discussions..... 50
III.A.6	Identification des produits séparés M1, N1, L1 51
III.B	Extraction et détermination des compositions des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i> 73
III.B.1.1	Historique..... 74
III.B.2	Définition d'une huile essentielle..... 75
III.B.3	Propriétés fondamentales des huiles essentielles..... 76
III.B.3.1	Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles 76
III.B.3.2	Comment définir une huile essentielle..... 78
III.B.3.3	Rôle et intérêt thérapeutique des huiles essentielles..... 79
III.B.3.3.a	Rôle physiologique..... 79
III.B.3.3.b	Rôle thérapeutique..... 80
III.B.4	Procédés d'obtention..... 83
III.B.5	Méthodes et procédés d'identification..... 84
III.B.6	Identification des composées des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i> 85
III.B.6.1	Matériel végétal et extraction des huiles essentielles..... 85
III.B.6.2	Les conditions analytiques..... 86

III.B.6.3 Discussion des résultats.....	89
Bibliographie.....	90
CHAPITRE IV : Etude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique et des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i>	
IV.1 Introduction sur les bactéries.....	94
IV.1.1 Principaux germes responsables d'infections nosocomiales.....	94
IV.1.2 Sensibilités aux agents anti-microbiens.....	96
IV.2 Etude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique du <i>Pituranthos scoparius</i>	98
IV.2.1 Les méthodes utilisées	98
IV.2.1.a Méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques).....	98
IV.2.1.b Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice).....	100
IV.2.2 Résultats et discussion.....	102
IV.2.2.a Résultats de l'antibiogramme	102
IV.2.2.b Résultats de la CMI	103
IV.2.3 Discussion des résultats.....	104
IV.3 Etude de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i>	105
IV.3.1 Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques).....	106
IV.3.2 Détermination de la CMI.....	106
IV.3.3 Résultats de l'étude de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles des graines et des tiges du <i>Pituranthos scoparius</i>	106
IV.4.4 Discussion des résultats.....	109
Bibliographie.....	110
Conclusion générale.....	111

INTRODUCTION GENERALE :

La survie et la reproduction de toutes les espèces animales dépendent essentiellement :

- de l'abondance et de la qualité de la nourriture .
- de leur état de santé et de leur bien être.
- des conditions de l'environnement.

Ainsi, pour les animaux, le maintien de leur santé et la recherche de leur bien être figurent au rang de leurs principales occupations. Ils utilisent intuitivement ou instinctivement des plantes non seulement pour se nourrir mais aussi pour se soigner. Et l'homme n'échappe pas à cette règle ! Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire [1]. Celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal.

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

Tous les être vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines acides aminés. Les métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes. Il existe aussi le métabolisme secondaire propre aux plantes : c'est une exclusivité du monde végétal [2, 3].

Les substances fournies par ce dernier ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante : on les appelle les métabolites secondaires.

Ces produits à structures chimiques souvent complexes, sont très dispersés et très différents selon les espèces. C'est seulement à partir de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle qu'il y a eu explosion des recherches dans ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse :

- Chromatographie .
- Résonance magnétique nucléaire.
- Spectrométrie de masse.

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 20000 produits classés par leur appartenance chimique :

- Lipides particuliers : saturés et insaturés.
- Composés acétyléniques.
- Polyketides : mycotoxines, phytoalexines.

- composées phénoliques : dérivés de l'acide benzoïque, l'acide cinnamique, flavonoïdes
- Alcaloïdes etc.....

Parmi les composés chimiques appartenant aux plantes et qui ont prouvé leurs activités cytotoxiques et thérapeutiques on peut citer les flavonoïdes [4].

Les flavonoïdes ont une distribution botanique assez importante métabolisés dans les plantes, ils sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux, on les trouve dissous dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes.

Les huiles essentielles contenues dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles se retrouvent dans les différentes parties de la plante aromatique (feuilles, fleurs..). Elles sont généralement extraites par distillation à la vapeur d'eau sauf pour les essences aromatiques qui sont extraites des agrumes par expression et ne sont donc pas des huiles mais des essences aromatiques.

Dans ce contexte et notamment dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire –Laboratoire d'obtention de substances thérapeutique (LOST)- sur les plantes médicinales nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de l'espèce *Pituranthos scoparius* (*Deverra scoparia*) appartenant à la famille des ombellifères [5]. C'est une plante vivace qui pousse en touffes importantes [6], elle est commune dans la partie Nord du Sahara et réputée rare plus au Sud. Elle a été peu étudiée ; ce qui nous a encouragés à entreprendre ce travail divisé en 4 chapitres :

Chapitre I : Etude antérieure du genre *Pituranthos*.

Chapitre II : Etude bibliographie sur les différents squelettes flavonoidiques.

Chapitre III : Etude phytochimique et extraction des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius*.

Chapitre IV : Etude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique et des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FOUCHE, J. G., MARQUET, A, HAMBUKERS, A. (2001). Observation du monde des plantes. Ed. Masson, France.
- [2] CROUT, D. H., GEISSMAN, T. A. (1969). Organic chemistry of secondary plant metabolism, Freeman Cooper, San Francisco.
- [3] HASLAM, E. (1985). Metabolites and metabolism, Oxford university press. Oxford.
- [4] GONNET, J. F. (1989). Thèse de doctorat d'état, Université Claude-Bernard, Lyon
- [5] OZENDA, P. (1958). Flore du Sahara, Ed. CNRS Paris, France.
- [6] BELLAKHDAR, J. (1997) Médecine Arabe ancienne et savoirs populaires, la pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibis Press, France.

Chapitre I

Travaux antérieurs sur le genre
Pituranthos

I.1-Aspect botanique :

I.1- Taxonomie :

On peut définir la famille des ombellifères du point de vue botanique selon les divisions suivantes :

Embranchement → Angiospermes

Classe → Dicotyledones

Sous classe → Melophyta choripetalae

Ordre → Araliales

Famille → Apiaceae (ombellifères)

I.1-1 Caractères Diagnostiques :

Selon Ozenda [1], l'identification botanique des ombellifères est relativement facile mais pour le genre *Pituranthos*, la distinction entre les espèces est délicate, on ne peut les distinguer les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule. On peut trouver plus de vingt espèces dans le genre *Pituranthos*, certaines sont endémiques à l'Afrique du Nord [1, 2] et rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

En Algérie le potentiel floristique comporte les espèces suivantes :

-*P. scoparius*, *P. chlooranthus*, *P. battandieri* [3]

Selon Quezel [2], le genre *Pituranthos* est décrit comme une plante vivace, totalement aphyllé, à tiges très ramifiées et des précarpes ovoïdes à six bandelettes.

I.1.2 -L'espèce *Pituranthos scoparius*:

L'espèce *Pituranthos scoparius* appelée aussi *Deverra scoparia*, Benth et Hook selon le même auteur, est une plante dont les tiges sont rameuses et jonciformes. C'est une plante vivace qui pousse en touffes importantes atteignant plus de 1m de haut [4].

Les tiges de couleur brun-jaunâtre, droites, ramifiées, uniquement dans leur partie supérieure, ne portent pas des feuilles ou seulement quelques unes réduites à des écailles. Les fleurs de couleur blanche sont réunies en ombelles latérales courtement pédonculées de 1 à 3 cm.

Les fruits sont plus longs que larges et sont recouverts de poils dressés.

Toute la plante dégage une odeur agréable, elle résiste à la sécheresse et se rencontre souvent dans des endroits plus ou moins secs.

I.1-3 Localisation :

L'espèce *Pituranthos scoparius* (*Deverra scoparia*), est une plante maghrébine, généralement commune dans la partie nord du Sahara et réputée rare plus au sud [4].

On l'observe pourtant très fréquemment sur le plateau du Tassili, surtout dans les lits d'oueds caillouteux. On la rencontre généralement dans la région de Biskra, Boussaâda, Saoura et Ghardaïa [5]. Elle pousse aussi dans les monts des Aurès avec une prédilection pour les terrains calcaires (Sebkha-Ain Mhila).

I.2 Utilisations traditionnelles :

L'espèce *Pituranthos scoparius* est appelée localement Guezzah. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle. En Tunisie (région de Monastir), l'extrait de la plante est utilisé dans le traitement de l'asthme [6]. Dans la région de Sbeitia le macéré aqueux des feuilles est utilisé en cas d'ictère, contre les morsures de vipère et aussi contre les piqûres de scorpion [6].

La poudre des feuilles est également utilisée pour soulager les douleurs rhumatismales.

Les fumigations des parties aériennes brûlées sont préconisées dans le traitement de certaines maladies des ovins comme la gale.

Les parties aériennes du *P. scoparius* dont l'odeur est un peu anisée, sont disposées en litière sur les braises ou dans les fours pour aromatiser la viande rôtie et les galettes de pain [6]. Les touaregs mangent à l'état cru les jeunes pousses et le cœur des racines de la plante.

Dans la médecine populaire Libyenne [7], les huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre. La population bédouine utilise les espèces *P. triradiatus* et *P. tortuosus* contre les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux ou comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes [8]. L'espèce *P. chloranthus* est également utilisée contre les céphalées en cataplasme sur la tête, mais il faut noter que le genre *Pituranthos* est aussi toxique, puisque d'après une étude sur la toxicité de la plante basée sur les tests du Dragendroff et à l'isoplatine, on a remarqué la présence d'alcaloïdes [2], mais il n'y a aucune étude chimique qui a confirmé cette hypothèse.

Le pollen des espèces *P. scoparius* et *P. chloranthus* engendre des ophtalmies graves, quand il pénètre dans les yeux des animaux, ce pollen rend les animaux aveugles pendant plusieurs jours.

I.3- Aspect chimique :

I.3.1- Données chimiotaxonomiques :

Les études sur le genre *Pituranthos* comprenant les espèces : *scoparius* , *triradiatus* et *tortuosus*, ont montré que les métabolites secondaires de ce genre se limitent aux coumarines et aux flavonoïdes et quelques composés. Des huiles essentielles de quelques espèces ont été également étudiées.

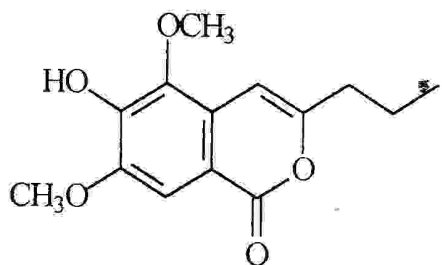
I-4 Travaux antérieurs sur le genre *Pituranthos* :

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Pituranthos*, n'ont concerné que les espèces, *triradiatus*, *scoparius* et *tortuosus*,. Les espèces *chloranthus* et *battandieri* n'ont pratiquement pas été étudiées.

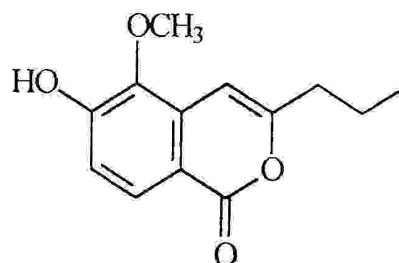
Dans les tableaux 1, 2, 3 figurent les différents composés isolés du genre *Pituranthos* :

TABLEAU 1 : les différents composés coumariniques du genre *Pituranthos*

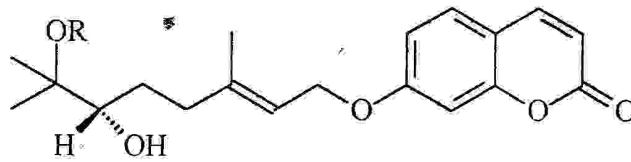
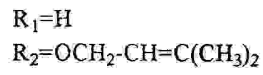
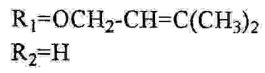
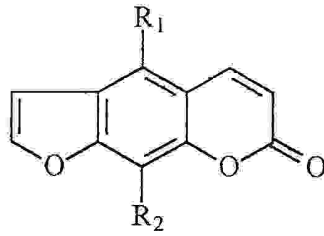
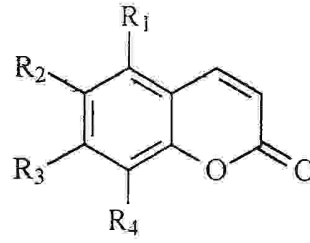
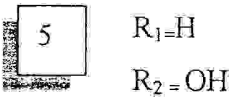
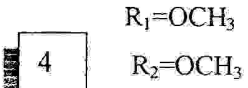
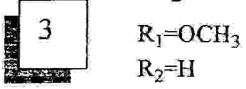
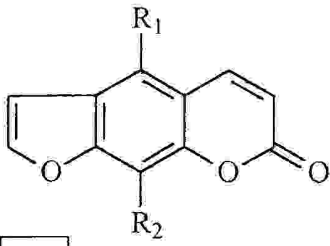
Espèce	Coumarine	Structure	Référence
<i>P. scoparius</i>	6-Hydroxy-5 méthoxy -3-propyl isocoumarine.	1	[9]
	5,7 -Diméthoxy-6 hydroxy-3 propyl isocoumarine	2	
<i>P. tortuosus</i>	-Bergabtène.	3	[12]
	-Isopimpinelline	4	
	-Xanthotoxine	5	
<i>P. triradiatus</i>	-(-S)- <i>trans</i> -marmarine.	6	[13]
	-Pituranthoside (-) -S- <i>trans</i> -marmarine-7'-O-β-D-glucopyranoside.	7	
	-Xanthotoxol.	8	
	-Bergabtène.	3	[14,15]
	-Umbelliferone.	9	
	-Isopimpinelline.	4	
	-Impératorine.	10	
	--Isoimpératorine.	11	
	-Marmésine.	12	[16]
	-Cnidiline	13	

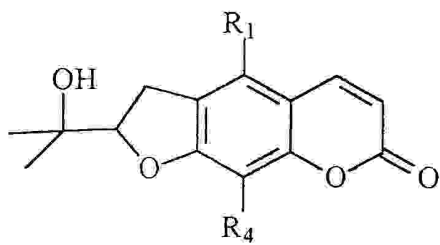


2



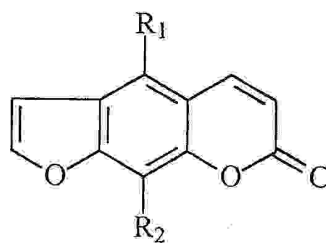
1





12

R₁=H
R₄=H

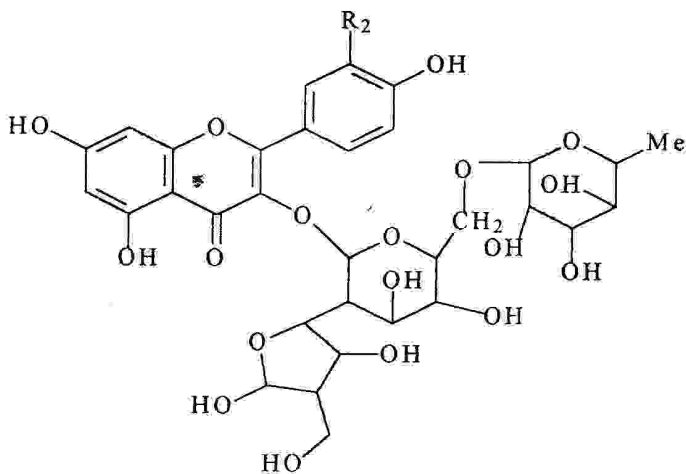


13

R₁=OCH₂CH₂-CH=C(CH₃)₂
R₄=OCH₃

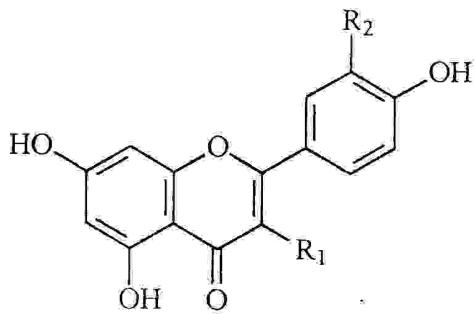
TABLEAU 2 : Les différents composés flavoniques du genre *Pituranthos*

Espèce	Flavonoïdes	Structure	Référence
<i>P. tortuosus</i>	3-Glucopyranosyloxy-4',5,7-trihydroxy 3'-méthoxyflavone.	14	[10]
	-Isorhamnetine.	15	
	-Chrysoériol.	16	
	-Isorhamnetine 3-O- glucoside.	17	
	-isorhamnetine 3-O-rutinoside.	18	



R₂ = OMe

14



R₁= H
R₂= OCH₃

16

R₁= OH

R₂= OCH₃

15

17

R₁= O glu

R₂= OCH₃

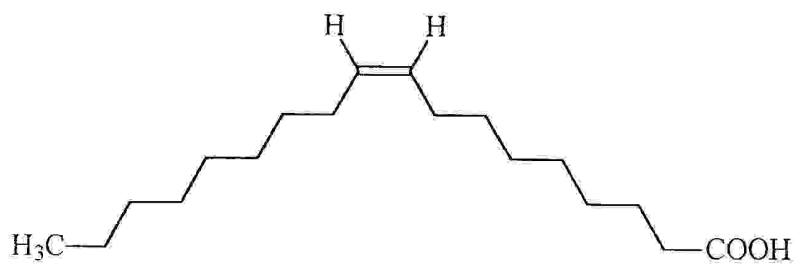
18

R₁= O-rutinoside

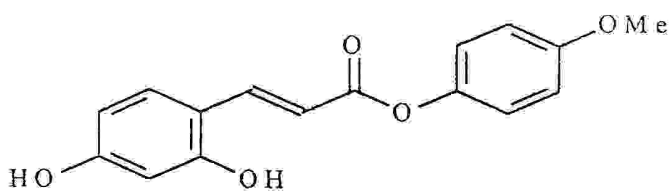
R₂= OCH₃

TABLEAU 3: Autres composés isolés du genres *Pituranthos*:

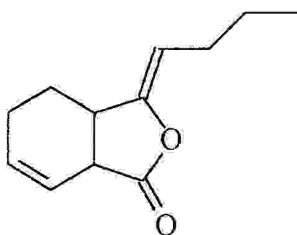
Espèce	Composé	Référence
<i>P. scoparius</i>	-Acide oléique	[9]
<i>P. tortuosus</i>	Umbellate de para-méthoxyphényle -Ligusticum. -Ligustilide	[11]



Acide oleique



Umbellate de para-méthoxyphenyle



ligustilide

BIBLIOGRAPHIE

- [1] OZENDA, P. (1958). Flore du Sahara, Ed. CNRS. Paris, France.
- [2] QUEZEL, P., SANTA, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales, Vol.1-2 Ed. CNRS, Paris, France.
- [3] BELLAKHDAR, J., (1997). Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, la pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibis presse, France.
- [4] BEN CHELAH, A. C., BOUZIANE H., MAKAL, M., OUAHES, C. (2000). Fleurs du Sahara. Voyage et hobotanique avec les Touaregs du Tassili. Ibis presse, France.
- [5] NEGRE, R. Petite Flore des régions arides du Maroc Occidental, Tome 2 Ed. CNRS Paris, France.
- [6] BOUKEF, M. K. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Les plantes de la médecine traditionnelle Tunisienne, agence de coopération culturelle et technique, Paris, France.
- [7] AL KADI, A. A. (1989). Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Lybie, vol 1-2.
- [8] NOVAK, I., BUZAS, G., MINKER, E., KOLFAL, M., SZENDREI, K. (1966). *Planta med.* 14, 57-59.
- [9] BADA, H., DENNABED, M., GEORGES, M., CHRISTOPHE, L., LAVAUD, C. (2004). Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*, Natural product research. 1-5.
- [10] SINGAB, A. N., KHALIFA, T., MAHRAN, G. H., OKADA. Y., MATSUMARU, Y., NISHINO, H., OKUYAMA, T. (1998). *Natural Medicines* vol 52 (2), 191-194.

- [11] ABDEL-MOGIB, M., AYYAD, S. N., METWALLY, M. A., DAWIDAR, A. M. (1992). Pakistan Journal of Scientific and industrial Research 35(3), 93-95.
- [12] ABDEL-KADER, M. S. (2003). Journal of the Brazilian Chemical Society 14 (1), 48-51.
- [13] HALIM, A. F., SAAD, H. E. A., LAHLOUB, M. F., AHMED, A. F. (1995). Phytochemistry, 40(3), 927-929.
- [14] HALIM, A. F., SAAD, H. E. A., LAHLOUB, M. F., AHMED, A. F. (1989). 37 th. Annual congress of the Society of the Medicinal Plant Research, Braunschweig Germany, 5-9 September .
- [15] HALIM, A. F., SAAD, H. E. A., LAHLOUB, M. F. AHMED, A. F. (1991). J. Pharm. Sci., 7. 402-404.
- [16] ASHKENAZY, D., FRIEDMAN, J., KASHMAN, Y. (1983). Journal of Medicinal Plant Research , 47, 218-220.

chapitre II

LES FLAVONOÏDES

II LES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes constituent une famille relativement diversifiée de molécules aromatiques, ces métabolites secondaires dérivent de la phénylalanine (le noyau B et les carbones C₂, C₃ et C₄ de l'hétérocycle C), et du malonyl-CoenzymeA (le noyau A) [1].

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, pollen, fruits, graines, bois, ... etc.

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine du visible mais ils présentent tous une bande d'absorption dans l'ultraviolet proche du visible. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes. Ils ont un goût désagréable et possèdent une diversité structurale très importante. En effet, plus de 6500 structures ont été identifiées [2].

II.1 Définition et structure :

Le squelette de base des flavonoïdes est constitué de 15 atomes de carbone, répartis sur deux noyaux benzéniques qui sont reliés par une chaîne linéaire de 3 atomes de carbone [3], soit un système C₆-C₃-C₆ [4], comme le montre *la figure (1)*.

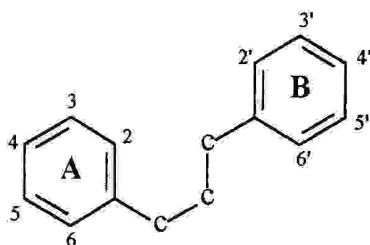


Figure (1) : Le squelette de base des flavonoïdes

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C 3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou familles dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [5].

Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 comme le montre la figure (2).

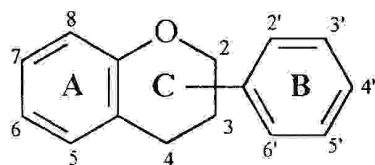


Figure (2)

La figure (3) illustre les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes.

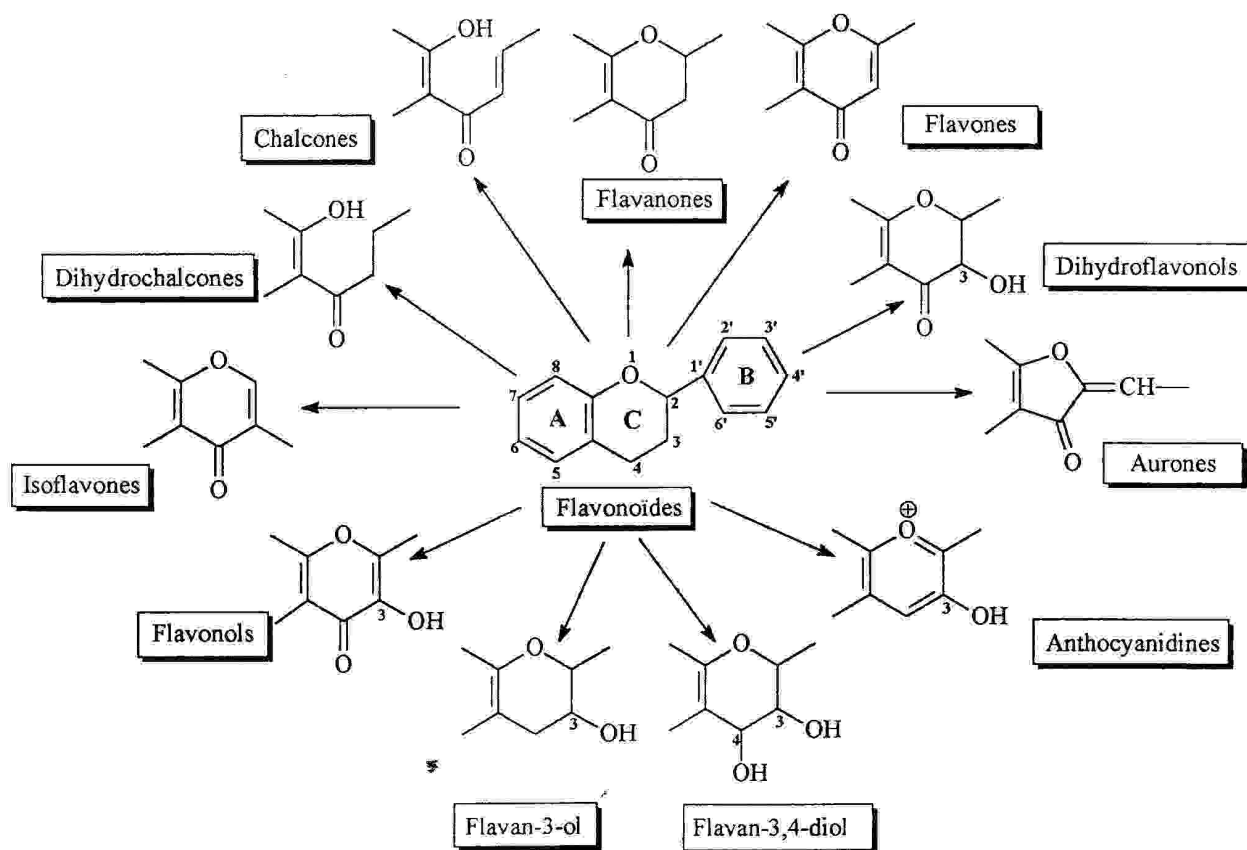


Figure (3) : Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

II.1.1 Biosynthèse des flavonoïdes :

Les composés de départ sont le malonyl-CoA et les **dérivés-CoA de l'acide cinamique** (cinamoyl-CoA) : ces derniers se forment avec l'intervention de cinamoyl-CoA lipase. C'est l'acétyl-CoA carboxylase qui prépare le malonyl-CoA où trois molécules de cette dernière et le cinamoyl-CoA produisent avec l'intervention de **la chalcone synthase**, la structure de base en C-15 sous forme d'une **chalcone** soit la 4, 2', 4', 6'-**tetrahydrochalcone** [6]. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la **synthèse** des divers flavonoïdes. Elle est en **équilibre** avec les flavonoïdes. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme la chalcone isomérase, cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition *syn* sur la double liaison) conduisant à la seule **(2S)-flavanone** [7].

- Les **aurones** dérivent directement des **chalcones**.
- L'oxydation des **flavanones** suivie de réarrangement, c'est-à-dire le déplacement d'un groupement aryle de C-2 à C-3 en présence d'enzyme **Isoflavone synthase** conduit à la formation d'**isoflavone** ; elle est considérée comme une réaction spécifique pour la biogenèse des **isoflavonoïdes** [8] où le composé 2-hydroxy isoflavone est considéré comme un intermédiaire [9].
- L'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les flavanones conduit à la formation des **flavones** cette réaction est catalysée par deux types d'enzymes différentes : **la flavone synthase I** et **la flavone synthase II (FNSI et FNSII)**.
- L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux **dihydroflavonols**, cette réaction est catalysée par l'enzyme **flavanone 3-hydroxylase**.

Le dihydroflavonol est considéré comme un intermédiaire direct pour la synthèse des **flavonols** et des **flavan-3,4-diols**.

C'est un intermédiaire biosynthétique dans la formation des **proanthocyanidines**, **anthocyanidines** et **catéchines (flavanols)**.

- Les **flavonols** sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les dihydroflavonols en présence d'enzyme **flavonol synthase**.

Toutes ces étapes sont reportées dans **la figure (4)**.

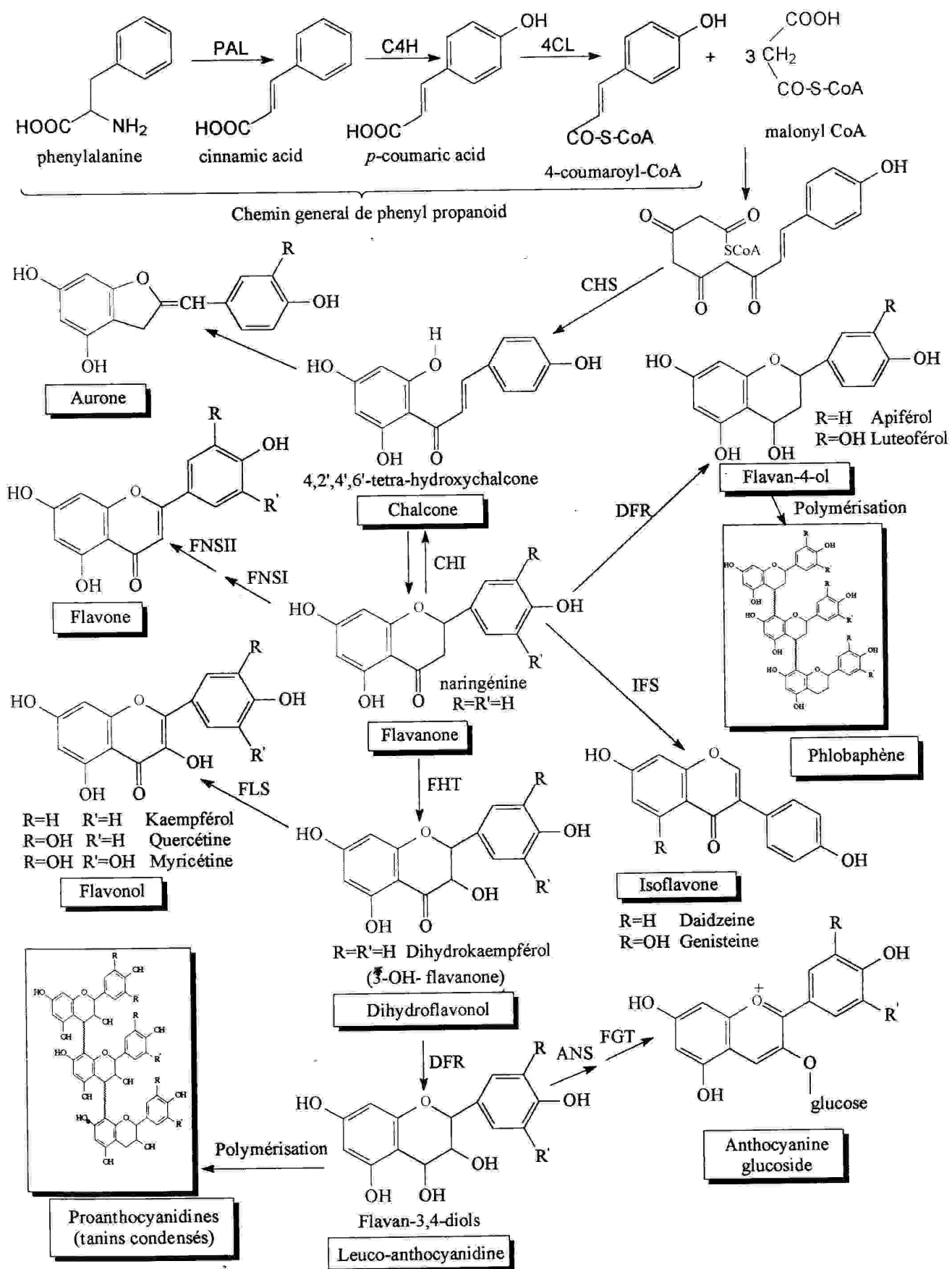


Figure (4) : Chemin biosynthétique des flavonoïdes.

Le tableau 1 rassemble les différentes enzymes mises en jeu dans la biosynthèse reportée dans *la figure (5)* [10,11].

Tableau 1 : liste des enzymes.

<i>Les abréviations D'enzymes</i>	<i>Les enzymes</i>	<i>Les Co-facteurs</i>
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase	/
C4H	Cinnamate 4-Hydroxylase	NADPH
4CL	4-coumarate CoA-lipase	CoA-sh, ATP
CHS	Chalcone synthase	/
CHI	Chalcone isomerase	/
DFR	Dihydroflavonol-4-reductase	NADPH
IFS	2-Hydroxyisoflavanone synthase	NADPH
FHT	Flavanone 3-Hydroxylase	2-oxoglutarate Fe ²⁺ , ascorbate
FLS	Flavonol synthase	2-oxoglutarate Fe ²⁺ , ascorbate
ANS	Anthocyanin synthase	Non connue
FGT	Flavonoid 3-O-glucosyl-transferase	UDPG
FNSI	Flavone synthase I	2-oxoglutarate Fe ²⁺ , ascorbate
FNSII	Flavone synthase II	NADPH

II.2 Les activités biologiques des flavonoïdes et leurs effets sur la santé :

II.2.1- *Les flavonoïdes et la santé :*

Les flavonoïdes sont des composés non nutritifs [12]. Un nombre considérable de travaux a été orienté vers leur activité antioxydante et la propriété de fixation de plusieurs espèces oxydantes (radical scavengers), ainsi que leurs propriétés anti- mutagéniques et anticancérigènes. Cependant, le grand intérêt a été donné à leur potentiel dans la prévention de maladies cardiovasculaires [13].

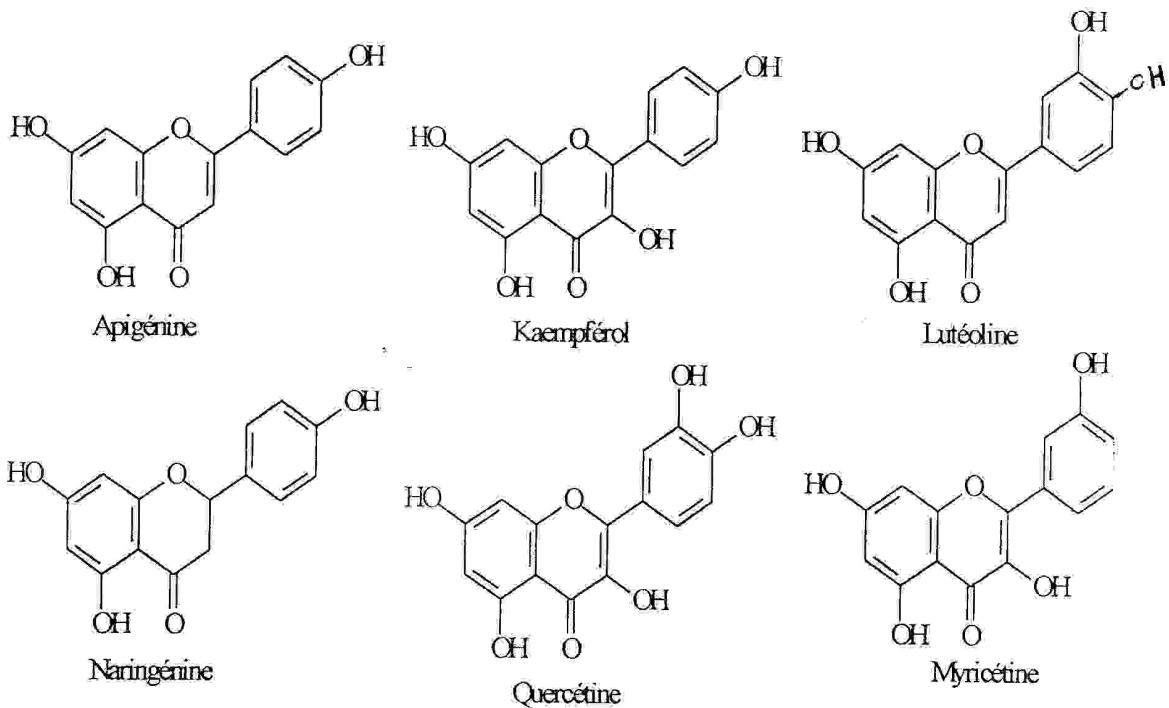
Le thé, les oignons et les pommes sont la principale source d'apport des flavonoïdes (le thé 48% de la prise totale, les oignons 29% et les pommes 7%) [14], les flavonoïdes sont le facteur le plus fortement lié à la diminution du risque de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires chez les sujets âgés.

Parmi les flavonoïdes dont les activités sont reconnues, on a les flavonols : la quercétine (Q), le kaempférol (K), la myricétine (M) et les flavones : l'apigénine (A) et la luteoline (L), existent dans 28 légumes et 9 fruits [15]. La quercétine est le majeur flavonoïde diététique (il est représenté par des prises de 16 mg/jour), suivi du kaempférol (4 mg/jour), la myricétine (1,4 mg/jour), la lutéoline (0,92 mg/jour) et enfin par l'apigénine (0,69 mg/jour). Une étude épidémiologique de l'effet des flavonoïdes diététiques sur la santé (la consommation alimentaire des flavonoïdes) est rassemblée dans le tableau (2).

Ce tableau porte aussi, les rapports inverses entre les fruits et les légumes prises et le cancer des poumons [16] et entre la consommation de l'oignon et le carcinome de l'estomac (stomach carcinoma), seulement un léger rapport préventif a été trouvé entre la consommation alimentaire des flavonoïdes et la mortalité due aux cancers [17]. Par contre, l'effet protecteur antioxydant des flavonoïdes dans la prévention des maladies cardiovasculaires a été mis en évidence bien que ce ne soit pas concluant [18].

Tableau (2) : L'évidence épidémiologique des effets des flavonoïdes consommés sur la santé [18].

<i>Les effets sur la santé</i>	<i>Le flavonoïde consommés</i>	<i>Réf.</i>
<u>I-les maladies cardiovasculaires :</u>		
✓ Risque réduit des maladies cardiovasculaires	Q, K, M, A, L	[19]
✓ "	Q, K, M, A, L	[20]
✓ "	Q, K, M	[21]
✓ "	Q, K, M, A, L	[22].
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et les maladies cardiovasculaires	Q, K, M, A, L	[23]
✓ Aucune association entre la quercétine prise et l'accident vasculaire cérébral	Q	[24]
✓ Augmentation du risque de la cardiopathie ischémique	Q, K, M	[25]
✓ Risque réduit de l'infarctus du myocarde	Q, K, M, A, L	[16]
✓		
<u>II- Cancer :</u>		
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et le cancer	Q, K, M, A, L	[26]
✓ "	Q, K, M, A, L	[27]
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et le cancer des poumons	Q, K, M, L	[28]
✓ Relation inverse entre le flavonoïde pris et le cancer des poumons	Q, K, M, A, L	[29]
✓ "	Q, naringénine	[30]
✓ Relation inverse entre le flavonoïde pris et le cancer de l'estomac	Q, K, M, L	[31]



Les résultats positifs, rassemblés dans le **tableau (2)**, ont contribué à l'augmentation extraordinaire de l'usage des plantes. Il faut signaler que la prise incontrôlée des flavonoïdes peut entraîner des activités pro-oxydatives ou mutagéniques en plus de l'inhibition des enzymes qui constituent la clé des métabolismes des hormones [32].

II.2.2 - L'activité antimicrobienne des flavonoïdes :

Il est connu que les **flavonoïdes** sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne, il est logique par conséquent qu'ils soient des substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes [33, 34].

Il a été montré que les composés flavoniques les moins polaires, c'est-à-dire les moins substitués par des groupes OH sur le noyau B, sont les plus actifs *vis-à-vis* des microorganismes, cela est renforcé par la découverte que la méthylation des flavonoïdes augmente l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* [35].

Dans le cas du méthicilline-résistant *S. aureus*, les chaînes aliphatiques latérales dans les flavones (dans la position 6 ou 8), rendent la molécule plus lipophile et augmentent son activité antimicrobienne comparée aux flavones non

substituées [36]. Il a été montré avec la bactérie cariogénique (*Actinomyces viscosus* et *A. naeslundii*, *Streptococcus*) que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux A et B essentiellement (**5-OH**), en plus d'une substitution aliphatique sur le noyau A, détermine l'activité antibactérienne des flavones [37]. Cependant, il a aussi été constaté que les flavonoïdes lipophiles (**méthoxylés**) n'étaient pas de bons agents protecteurs contre les microorganismes [38], cela est confirmé par le fait que les dérivés glycosylés de la quercétine et de la quercétagine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les microorganismes patho-gènes.

La présence des groupes hydroxyles libre dans les positions 3, 3', 4'et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [39].

II.2.3 - Autres activités des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent aussi d'autres activités biologiques et pharmaceutiques, ils sont notamment.: anti-allergiques [40], anti-inflammatoires et analgésiques [41], anti-influenzas, antifongiques, antiviraux [42], on leur reconnaît également une activité anti-malaria [43].

II.3-Méthodes d'analyses des flavonoïdes.

L'analyse structurale des composés flavoniques est très délicate, ceci est dû à la grande variété et réactivité de ces composés [44]. Les méthodes modernes d'analyse sont :

La chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**) avec la spectrométrie de masse (**MS**), la résonance magnétique nucléaire (**RMN**), la spectrophotométrie (**UV-Visible**) en plus du calcul du R_f [45] et la fluorescence sous la lumière **UV-Visible**, qui révèlent des renseignements utiles sur la structure moléculaire probable.

II.3.1- LES METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOIDES :

II.3.1.1 - LE R_f :

La valeur du R_f est définie comme suit :

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

Il existe une relation entre la structure flavonique et le R_f . Cette valeur ne peut pas être considérée comme une constante physique du corps car elle est influencée par de nombreux facteurs tels que la qualité de la matière, la nature du solvant, la technique employée, la température [46, 47] ainsi que les substituants et leur position sur le squelette flavonique, **tableau 3**.

TABLEAU (3) : Relation R_f -Structure flavonique.

<i>Structure flavonique</i>	R_f
<i>Augmentation des groupes hydroxyles</i>	<ul style="list-style-type: none">• R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux.
<i>Méthylation des hydroxyles</i>	<ul style="list-style-type: none">• R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
<i>Glycosylation</i>	<ul style="list-style-type: none">• R_f augmente dans les systèmes de solvants aqueux et diminue dans les systèmes de solvants organiques.

II.3.1.2 - LA FLUORESCENCE SOUS LA LUMIERE DE WOOD :

La fluorescence d'un composé flavonique sous la lumière UV-Visible donne des informations très utiles sur sa structure chimique, **le tableau 4** donne la relation entre la fluorescence sous la lumière UV-Visible et les différentes structures flavoniques [48, 49].

TABLEAU (4) : Relation entre la fluorescence sous la lumière UV-Visible et les structures Flavoniques.

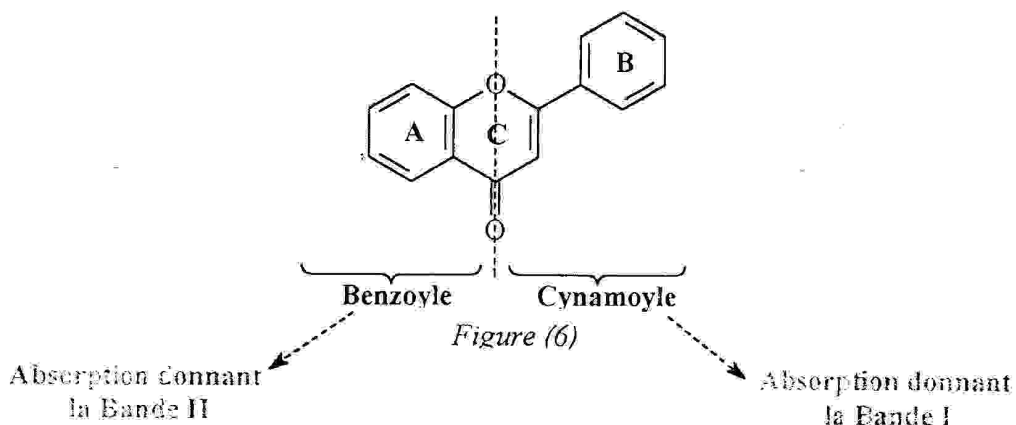
<i>La fluorescence</i>	<i>Les structures possibles</i>
Noire-Violette	<ul style="list-style-type: none"> • Flavones. • 5,6,7 ou 5,7,8-trihydroxy flavone. • Flavonol avec 3-OH substitué. • Chalcones.
Bleue	<ul style="list-style-type: none"> • Flavone ou flavonol sans OH en 5. • Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. • Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonol avec 3-OH et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	<ul style="list-style-type: none"> • Isoflavones
Jaune-verte	<ul style="list-style-type: none"> • Aurones
Verte	<ul style="list-style-type: none"> • Chalcones
Bleue-verte	<ul style="list-style-type: none"> • Flavanone sans 5-OH

II.3.1.3- SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE :

C'est la technique la plus utile pour l'analyse des structures flavoniques, plusieurs recherches ont été faites dans ce domaine [50, 51]. Cette technique permet la localisation des hydroxyles libres et de leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorptions par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol [52].

II.3.1.3.1- Le spectre UV-Visible des flavonoïdes dans le MeOH :

Le spectre d'absorption UV-Visible des flavonoïdes en milieu méthanolique présente deux bandes d'absorption principales : la **Bande I** et la **Bande II** comme le montre *La figure (6)*.



LA BANDE I :

Elle est attribuée à l'absorption du système cinamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison et le noyau B, elle donne des informations sur les variations structurales sur les deux cycles B et C.

Elle présente un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm.

LA BANDE II :

Elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec le cycle aromatique A, elle donne des informations sur les variations structurales sur ce noyau.

Elle présente un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm [53].

Le spectre UV-Visible des flavones dans le MeOH contient deux bandes d'absorption maximales :

- **Bande I** : dans la région [320-380] nm.
- **Bande II** : dans la région [240-270] nm.

Il y a quelques facteurs qui influent sur le déplacement des deux bandes d'absorptions [52], on peut les rassembler dans le **tableau (5)** :

TABLEAU (5) : L'influence de la structure flavonique sur le déplacement des bandes I et II.

<i>Structure flavonique</i>	<i>Les bandes d'absorption I et II</i>
<p><u>- Changement de substitution :</u></p> <ol style="list-style-type: none"> sur le noyau A sur le noyau B et l'hétérocycle C 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Affecte l'absorption de la bande II. ◆ Affecte l'absorption de la bande I.
<p><u>- Augmentation d'oxygénation :</u></p> <p>des groupes hydroxyles.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Déplacement des bandes vers les grandes longueurs d'onde (déplacement bathochrome).
<p><u>- Méthylation ou glycosylation :</u></p> <p>spécialement des positions 3, 5, 7 et 4' OH.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Déplacement des bandes vers les longueurs d'onde courtes (déplacement hypsochrome).
<p><u>- Acétylation</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Annule l'effet des groupes hydroxyles sur le spectre d'absorption.

II.3.1.3.2- L'addition des réactifs :

A - NaOH (ou NaOMe):

NaOH ou (NaOMe) est une base forte qui peut ioniser tous les groupes hydroxyles du squelette flavonique. Le déplacement bathochrome et la variation d'intensité de la bande I après l'addition de NaOH, nous renseignent sur le nombre et la position des hydroxyles libres [49]. L'apparition d'une nouvelle bande entre [320, 335] nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence de 7-OH libre dans les flavonoïdes.

B - NaOAc :

L'acétate de sodium est une base faible, elle ionise uniquement les hydroxyles les plus acides ; soit les groupements 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

C - (NaOAc+H₃BO₃) :

L'acide borique en présence d'acétate de sodium, forme des chélates avec les groupements orthodihydroxyles des noyaux benzéniques, à l'exception des positions C-5 et C-6, *figure (7)*.

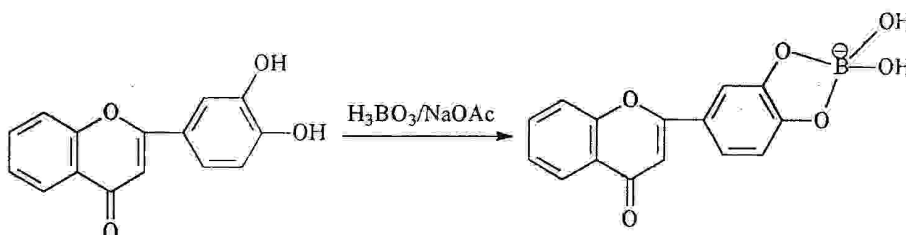


Figure (7)

D- AlCl₃ et (AlCl₃+HCl) :

En présence de chlorure d'aluminium, les flavonoïdes qui contiennent un groupe hydroxyle 5-OH [54,55], forment des complexes stables avec le groupement carbonyle voisin. Ils forment des complexes instables avec les groupements orthodihydroxyles [56]. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B, avec quelques exceptions, se décomposent en présence d'acide, par contre ceux formés entre le groupement carbonyle du C-4 et 5-OH ou 3-OH sont stables, *figure (8)*.

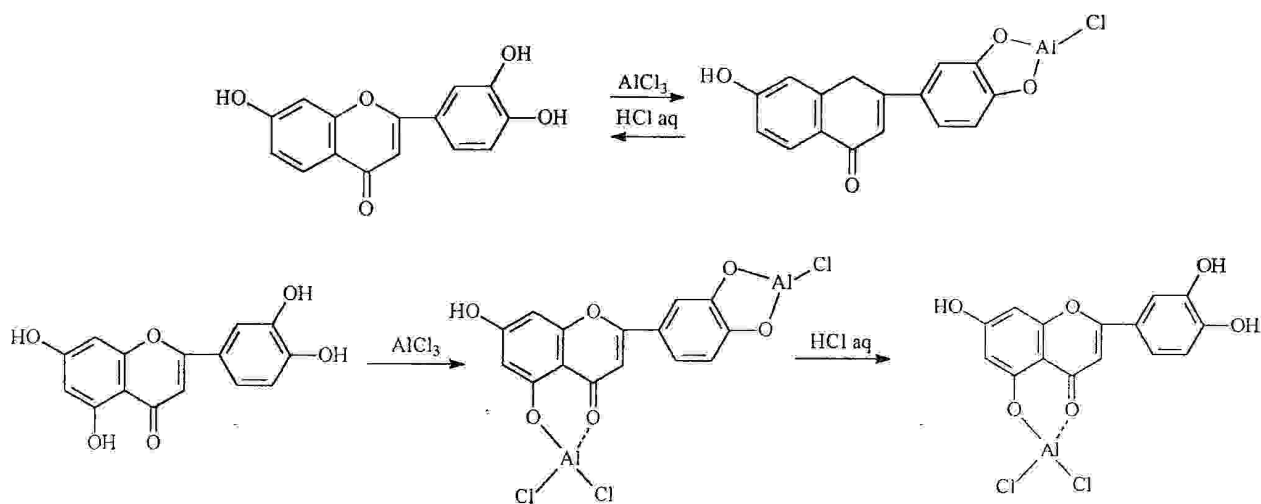


Figure (8) : Les différents complexes formés avec AlCl_3 en Présence d'acide.

- ♦ **Le tableau (6)** rassemble les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs dans le cas des flavones.

Tableau (6) : Les principaux déplacements des bandes I et II.

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	Flavones
	328-357	250-280	Flavonols 3-OR
NaOMe (NaOH)	- Stable +45 à +65		4'-OH
	1- L'intensité ne diminue pas/ MeOH.		4'-OR ; 3-OH
	2- L'intensité diminue/ MeOH.		3,4'-OH ; Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8) ; Ortho di-OH sur B.
	- L'intensité diminue avec le temps, décomposition.		

Tableau (6) : Suite, les principaux déplacements des bandes I et II.

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
NaOAc		+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8.	7-OH
		Pas de déplacement ou très faible.	7-OR
		Spectre qui se décompose avec le temps.	5,6,7-tri-OH ou 5,7,8-tri-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	+12 à +36		Ortho di-OH sur B
	+05 à +10		Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7, 8).
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430.		Ortho di-OH sur B avec 5-OH
MeOH / (AlCl ₃ + HCl)	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6.
	+35 à +55		5-OH et 3-OCH ₃
AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)	-20 à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360].		Ortho di-OH sur B.
	-20 à -25		Ortho di-OH sur A et ortho di-OH sur B ou tri-OH sur B.

/ = par rapport à.

(-) = hypsochrome.

(+) = bathochrome.

I.3.1.4 -LA SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

(RMN ^1H et ^{13}C) :

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton est une méthode qui nous informe sur l'environnement des différents protons, elle permet de connaître :

- La position et le nombre de substituants méthoxyles portés par le squelette flavonique [57, 58].
- Le nombre de sucres liés à l'aglycone ainsi que la nature de leur orientation (α ou β).
- La localisation des protons (H) de la molécule.
- La définition du modèle d'oxygénation

la RMN du C-13 est appliquée avec différents types de flavonoïdes naturels [59] elle donne des informations sur le squelette carboné de la molécule à travers :

- le nombre et l'environnement de chaque carbone.
- L'identification des liaisons C- (et O-) sucres.
- La détermination des points de liaison interglycosidiques.
- L'identification des substituants acyles et de leur sites d'acylation.

II.4-Conclusion :

Tels qu'ils viennent d'être décrits, les flavonoïdes (diversité structurale, intérêts biologiques et thérapeutiques) se révèlent importants pour l'homme, le végétal et les insectes, c'est ce qui nous a encouragés à entreprendre ce travail dans le cadre d'un vaste programme initié dans notre laboratoire (LOST) .

bibliographie

- [1] WINKEL-SHIRLEY, B. (2001). Flavonoid biosynthesis, A Colorful Model for genetics, *Biochemistry Cell Biology and Biotechnology, Plant Physiol.*, 126, 485-493.
- [2] HARBORNE, J.B., BAXTER, H. (1999). The handbook of natural flavonoids. Vol. 1 and 2, John Wiley and Sons, Chichester.
- [3] GUIGNARD, J. L., COSSON, L., HENRY, M. (1985). Abrégé de phytochimie, 143. Ed. Masson, France.
- [4] PARIS, M., HURABIELLE, M. (1981) . Abrégé de matière médicale, *Pharmacognosie*, Tome 1, 82. Ed. Masson, France.
- [5] GUIGNARD, J. (1974). Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants en pharmacie, 165. Ed. Lavoisier, France.
- [6] RICHTER, G. (1933). Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie, 333.
- [7] BRUNETON, J. (1993). Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales, Techniques et Documentation, Lavoisier, France.
- [8] KOCHS, G., GRISEBACH, H. (1986). *Eur.J.Biochem.*, 155, 311-312.
- [9] STOTZ, G., SPRIBILLE, R., FORKMANN, G..J. (1984). *Plant Physiol.*, 116, 173.
- [10] HELLER, W., FORKMANN, G., BRITSH, L., GRISEBACH, H. (1985 a). *Planta Med.*, 1, 163-191.
- [11] FORKMANN, G. (1992). Structure and Biogenesis of Flavonoids , 16^{ème} Assemblée des groupes polyphénols, Lisbonne, 16, 19-27.

- [12] HERTOOG, M. G. L., HOLLMANN, P. C. H., VENEMA, D. P. (1992a). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (9), 1591-1598.
- [13] MELTZER, H. M., MALTERUD, K. E. (1997). Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scand. J. Nutr.*, 41(2), 50-57.
- [14] COOK, N.C., SAMMAN, S. (1996). Flavonoids-chemistry, Metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 7, 59-61.
- [15] HERTOOG, M.G.L., HOLLMANN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, 20, 21-99.
- [16] KNEKT, P., ISOTUPA, S., RISSANEN, H., HELIÖVAARA, M., JÄRVINEN, R., HÄKKINEN, S., AROMAA, A. REUNANEN, A. (2000). Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54 (5), 415-417.
- [17] VOORRIPS, L.E., GOLDBOHM, R.A., VERHOEVEN, D.T., VAN POPPEL, G.A., STURMANS, F., HERMUS, R.J., VANDEN BRANDT, P.A. (2000). Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer *Cancer Causes and Control*, 11(2), 101-115.
- [18] ADLERCREUTZ, H. (1995). Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection, *Environ. Health Perspect.*, 103 (Suppl 7), 103-112.
- [19] HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man, *Arch. Toxicol. Suppl.*, 20, 237-248.
- [20] BÖHM, H., BOEING, H., HEMPEL, J., RAAB, B., KROKE, A. (1998). Flavonol, Flavone Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen, *Z. Ernährungswiss*, 37 (2), 147-163.

- [21] HERTOOG, M.G.L., FESKENS, E.J.M., HOLLMANN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet.*, 342 (8878), 1007-1011.
- [22] KNEKT, P., JÄRVINEN, R., REUNANEN, A., MAATELA, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *B. M. J.*, 312 (7029), 478-481.
- [23] HERTOOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., KROMHOUT, D. (1997 a). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk, *Lancet.*, 349 (9053), 699-700.
- [24] YOCHUM, L., KUSHI, L. H., MEYER, K., FOLSOM, A. R. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *Am. J. Epidemiol.*, 149(10), 943-949.
- [25] RIMM, E.B., KATAN, M. B., ASCHERIO, A., STAMPFER, M. J., WILLETT, W. C. (1996). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Ann. Intern. Med.*, 125(5), 384-389.
- [26] HERTOOG, M. G. L., SWEETNAM, P. M., FEHILY, A. M., ELWOOD, P. C., KROMHOUT, D. (1997 b). Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 65(5), 1489-1494.
- [27] HERTOOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., HOLLMANN, P.C. H., KATAN, M. B., KROMHOUT, D. (1994). Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study, *Nutr. Canc.*, 22(2), 175-184.
- [28] GOLDBOHM, R. A., VANDEN BRANDT, P. A., HERTOOG, M. G. L., BRANTS, H.A.M., Van POPPEL, G. (1995). Flavonoid intake and risk of cancer: A prospective cohort study, *Am. J. Epidemiol. Suppl.*, 141, 61S.
- [29] GARCIA-CLOSAS, R., AGUDO, A., GONZALEZ, C. A., RIBOLI, E. (1998). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain, *Nutr. Cancer*, 32 (3), 154-158.

- [30] KNEKT, P., JÄRVINEN, R., SEPPÄNEN, R., HELIÖVAARA, M., TEPPÖ, L., PUKKALA, E., AROMAA, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am. J. Epidemiol.*, 146(3), 223-230.
- [31] LE MARCHAND, L., MURPHY, S. P., HANKIN, J. H., WILKENS, L. R., KOLONEL, L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 (2), 154-160.
- [32] GARCIA-CLOSAS, R., GONZALEZ, C. A., AGUDO, A., RIBOLI, E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain, *Cancer Causes Control*, 10 (1), 71-75.
- [33] COS, P., YING, L., CALOMME, M., HU, J. P., CIMANGA, K., POEL, B.V., PIETERS, L., VLIETINCK, A.J., BERPHE, D.V. (1998). Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, *J. Nat. Prod.*, 61, 71-76.
- [34] COWAN, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4), 564-582.
- [35] RECIO, M.C., RÍOS, J.L., VILLAR, A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phytother. Res.*, 3 (4), 117-125.
- [36] IBEWUIKE, J. C., OGUNGBAMILA, F. O., OGUNDAINI, A. O., OKEKE, I. N., BOHLIN, L. (1997). Antiinflammatory and antibacterial activities of C-methylflavonoids from *Piliostigma thonningii*, *Phytother. Res.*, 11(4), 281-284.
- [37] TSUCHIYA, H., SATO, M., MIYAZAKI, T., FUJIWARA, S., TANIGAKI, S., OHYAMA, M., TANAKA, T., INUMA, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol.*, 50(1), 27-34.

- [38] SATO, M., FUJIWARA, S., TSUCHIYA, H., FUJII, T., IINUMA, M., TOSA, H., OHKAWA, Y. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria, *J Ethnopharmacol.*, 54 (2.3), 171-176.
- [39] MENDOZA, L., WILKENS, M., URZÚA, A. (1997). Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.*, 58 (2), 85-88.
- [40] MATSUDA, H., YANO, M., KUBO, M., LINUMA, M., OYAMA, M., MIZUNO, M. (1991). Pharmacological Study on *Citrus* fruits unshiu Markovich (2) on Flavonoid Components, *Yakugata Zasshi.*, 111, 193-198.
- [41] GALATI, E.M., MONFORTE, M.T., KIRJAVAINEN, S., FORESTIERI, A. M., TROVATO, A., TRIPODO, M.M. (1994). Biological Effects of Hesperidin, A *Citrus* Flavonoid (Note I), Anti-inflammatory and Analgesic Activity, *Farmaco.*, 40, 709-712.
- [42] SHAHAT, A.A., COS, P., BRUYNE, T. D., APERS, S., HAMMOUDA, F. M., ISMAIL, S.I., AZZAM, S., CLAEYS, M., GOOVAERTS, E., PIETERS, L., BERGHE, D.V., VLIETINCK, A.J. (2002). Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med.*, 68, 539-541.
- [43] MURAKAMI, N., MOSTAQUIL, H.M., TAMURA, S., ITAGAK, S., Horii, T.(2001). A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium* (*Hydrangea macrophylla*) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 2445-2447.
- [44] BRONZE, M.R., BOAS, L.F.V. (1998). Characterisation of brandies and wood extracts by capillary electrophoresis, *Analysis*, 26 (1), 40-47.
- [45] BATE-SMITH, E.C., WESTALL, R.G. (1950). *Bioch. Bioph. Acta.*, 4, 427-440.

- [46] RIBEREAU-GAYON, P. (1968). Les Composés Phénoliques des Végétaux. Dunod. Paris.
- [47] RAMDERATH, K. (1971). Chromatographie sur Couche Mince, editeur Gautier Villard, France.
- [48] HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. (1975). The flavonoïdes, Tome I, Academic Press, London.
- [49] MARKHAM, K.R. (1982). Techniques of The Flavonoids identification, Academic Press, London.
- [50] RAVANEL, P. (1983). Plantes Med. et Phytothérapie, Tome XVII, 3, 165-172.
- [51] HARBORNE, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London.
- [52] HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. (1975). The Flavonoids, Tome II, Academic Press, London.
- [53] JURD, L. (1962). The Chemistry of Flavonoid Compounds, 107-155, Oxford, Pergamon Press.
- [54] HÖRHAMMER, L., Hänsel, R. (1952). *Arch. Pharm.*, 285, 438-440.
- [55] JURD, L., GEISSMAN, T. A. (1956). *J. Org. Chem.*, 21, 1395-1398.
- [56] MARKHAM, K. R., MABRY, T. J. (1968). *Phytochemistry*, 7, 1197-1199.
- [57] WILSON, R. G., BOWIE, J. H., WILLIAMS, D. H. (1986). *Tetrahedron*, 24, 1407-1409.
- [58] RODRIGUEZ, E., CARMAN, N. J., MABRY, T. J. (1972). *Phytochemistry*, 11, 409-411.
- [59] WENKERT, E., GOTTLIEB, H. (1977). *Phytochemistry*, 16, 1811-1816.

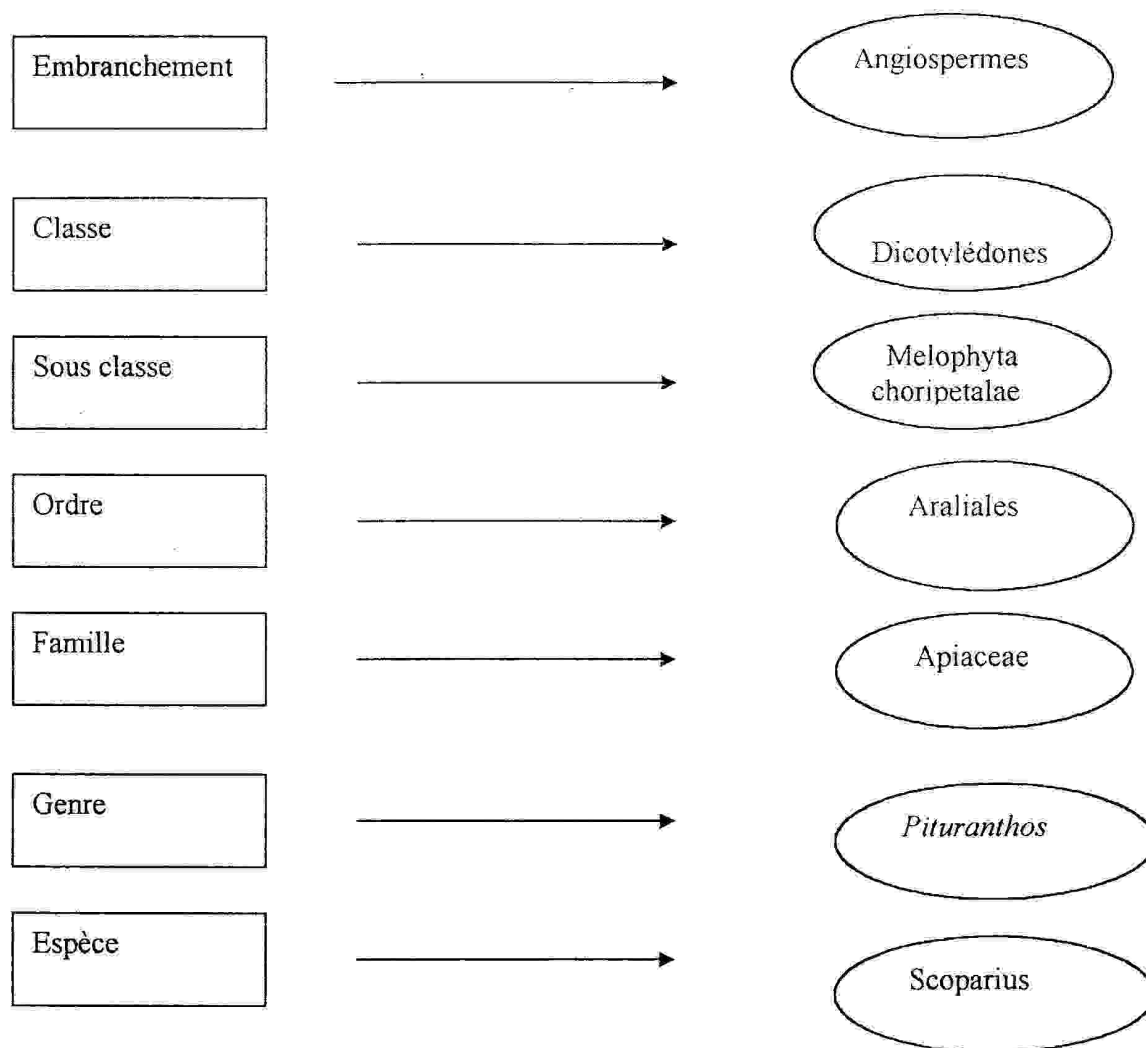
chapitre III

**Description des travaux d'extraction
phytochimique des parties aériennes
du *Pituranthos scoparius* et d'extraction
des huiles essentielles des graines et
des tiges.**

III.A- ETUDE PHYTOCHIMIQUE DU PITURANTHOS SCOPARIUS :

III.A.1 - Etude botanique :

III.A.1.1- Place dans la systématique :



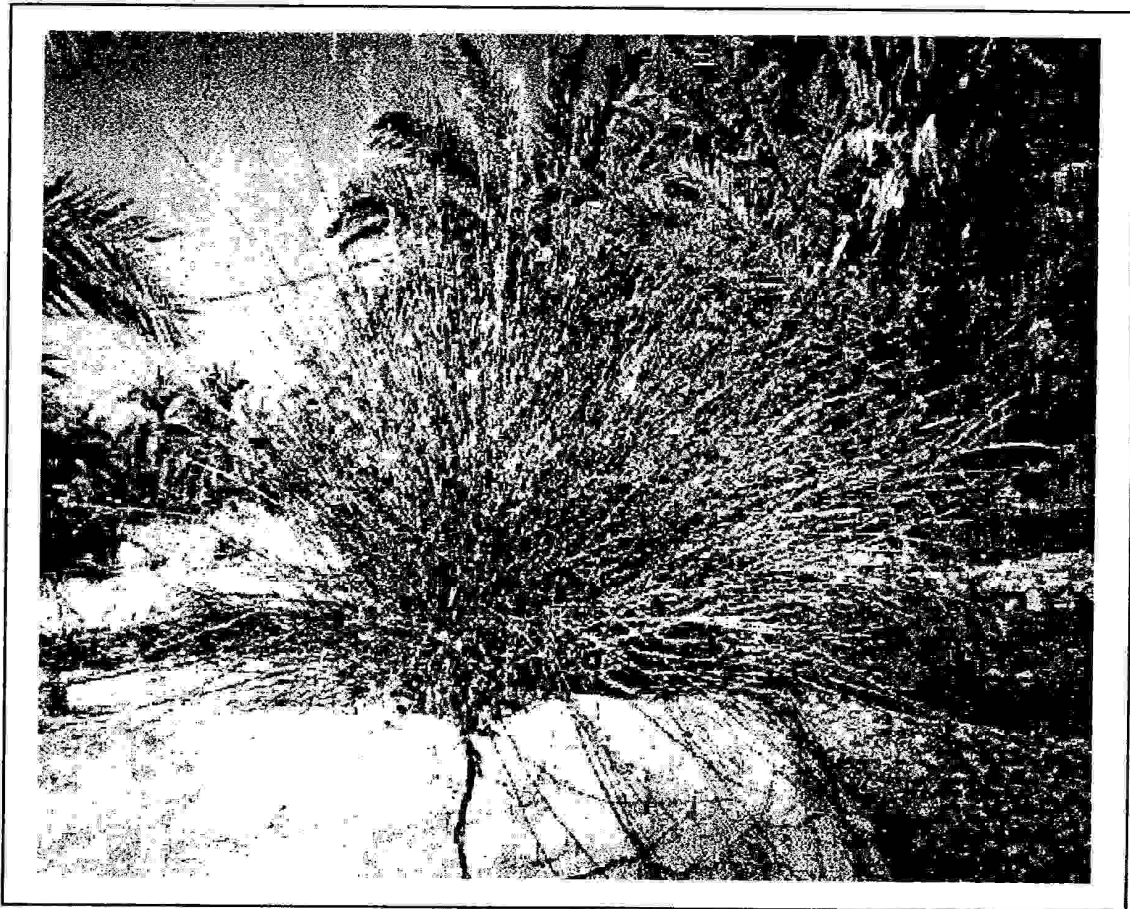
III.A.1.2- Description botanique :

La *Pituranthos scoparius* , objet de notre étude connue également sous le nom *Deverra scoparia*, appartient a la famille des ombellifères (*Apiacea*).

C'est une plante vivace qui pousse en touffes importantes atteignant plus de 1m de haut. Les tiges brunes jaunâtres, droites ramifient uniquement dans la partie supérieure. Les fleurs

Sont blanches groupés en ombelles à pédoncules courtes. Elle dégage une odeur agréable. En Algérie on rencontre la *Pituranthos scoparius* dans le Sahara septentrional notamment dans la région de Biskra, Boussaâda, et Saoura [1]. Elle pousse aussi dans les Aures et dans les terrains calcaires (Sebkha – Ain Mlila).

Voici la photo de la plante telle quelle est prise lors de la récolte a Ghardaïa :



Pituranthos scoparius (*Deverra scoparia*)

III.A.2- Matériel végétal et extraction :

III.A.2.1 Matériel végétal :

L'étude phytochimique est effectuée sur du matériel végétal prélevé d'une seule station, à quelques kilomètres de Ghardaïa au mois d'avril 2003.

le poids initial de la plante *Pituranthos scoparius* séchée était de 1200g (parties aériennes)

III.A.2.2 Extraction :

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole préconisé par LEBRETON (1967) [2], modifié par BOUTARD (1972)[3] , GONNET (1973) [4] et JAY (1975) [5].

La plante réduite en poudre, subit une macération dans un mélange des solvants MeOH /H₂O :70/30 (v/v) pendant 4 x 24 h.

Les diverse fractions récupérées sont réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieure à 50°C, jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux. Après évaporation du méthanol, la phase aqueuse obtenue subit une extraction liquide -liquide dans une ampoule à décanter, en utilisant les solvants suivants :

L'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane puis le n-butanol.

Après évaporation à sec, on a pesé les 4 extraits :

- L'extrait de la phase éther de pétrole : 0.51g
- L'extrait de la phase dichlorométhane : 1.82g
- L'extrait de la phase acétate d'éthyle : 1.02g
- L'extrait de la phase n-butanol : 18.69g

Le protocole adapté dans la figure suivante :

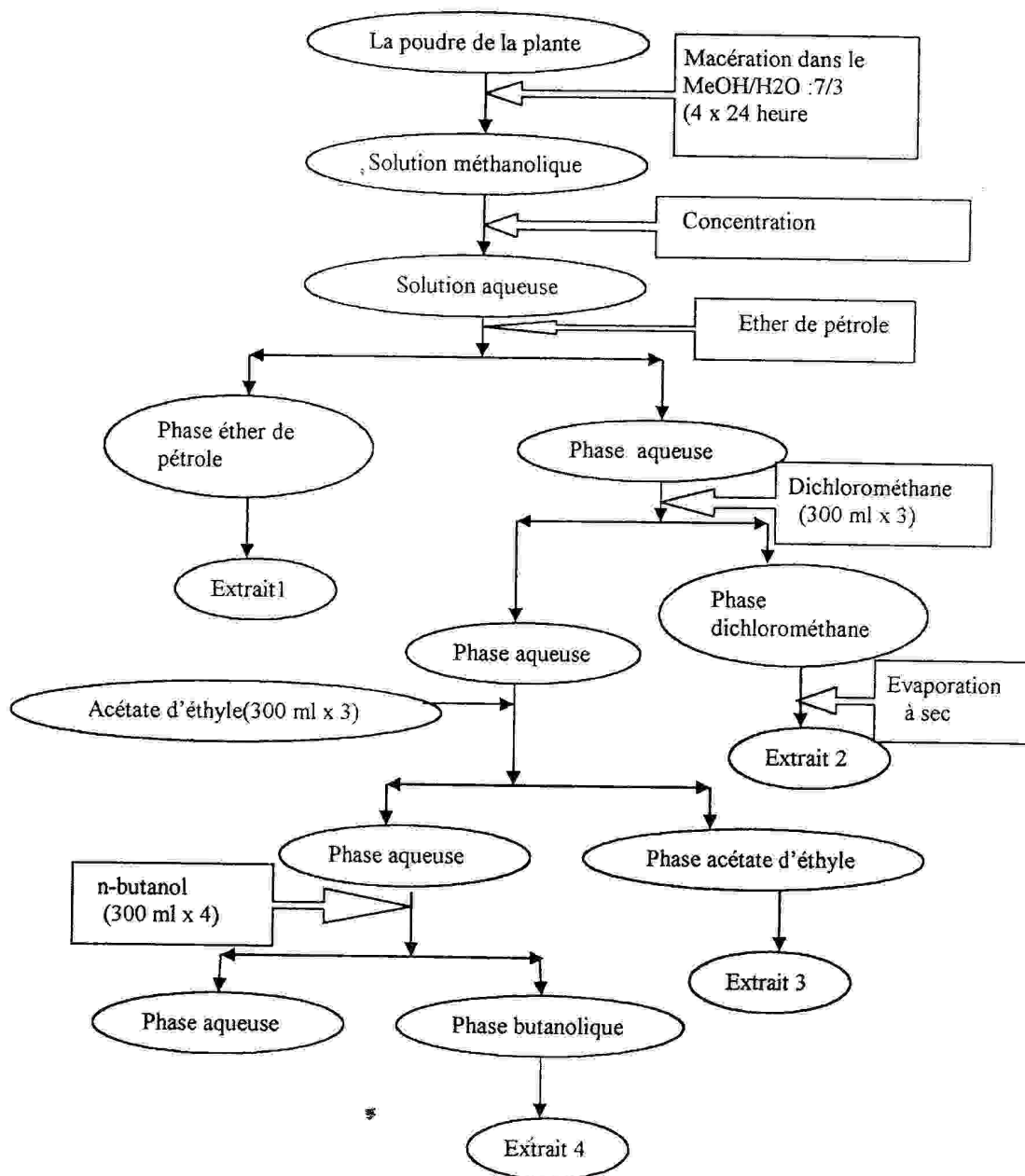


Figure 1 : Protocole d'extraction liquide -liquide

III.A.3- Contrôle chromatographique :

Pour avoir les empreintes des composées (flavoniques ou coumariniques) du *Pituranthos scoparius* et aussi pour avoir une idée sur les meilleurs systèmes de séparation, l'extrait butanolique subit une chromatographie bidimensionnelle sur papier et sur plaques de polyamide DC₆, en utilisant les systèmes chromatographiques suivants :

Système 1 : chromatographie sur papier en utilisant les solvants suivants :

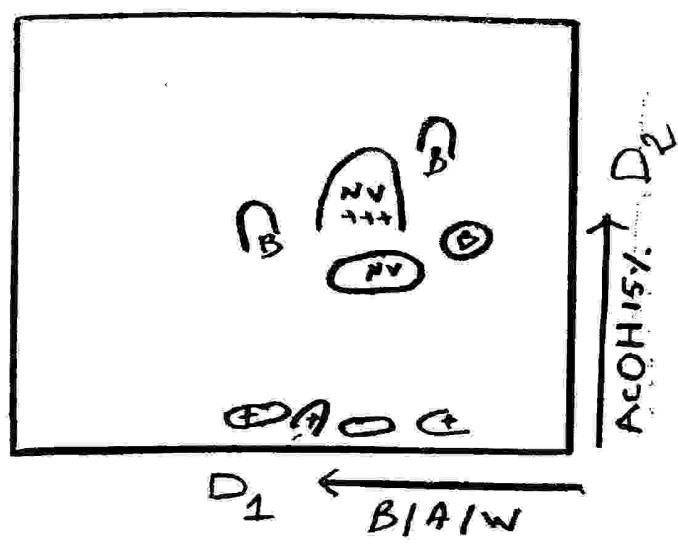
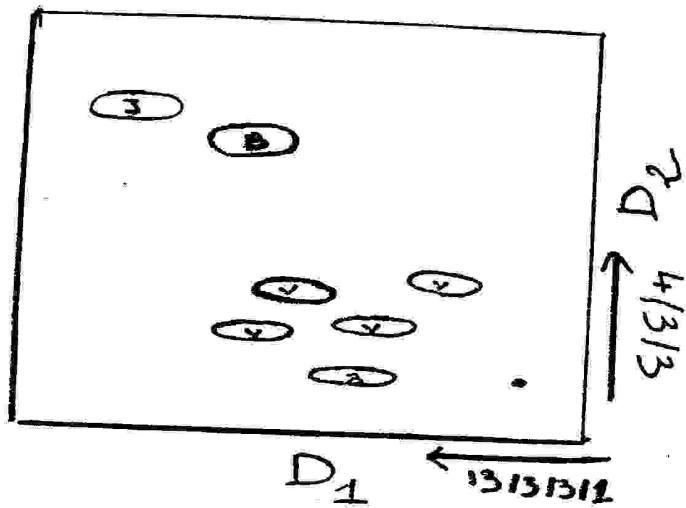
- la première dimension S_A : B / A / W (4 : 1 : 5)
- la seconde dimension S_B : AcOH 15%

Système 2 : chromatographie sur plaque de polyamide DC₆ en utilisant les systèmes suivants :

- la première dimension : S₁ : Toluène / Ethanol / Methyléthylcétone (4 / 3 / 3)
- la seconde dimension : S₂ : Eau / Ethanol / Methyléthylcétone / Acetylacétone (13 / 3 / 3 / 1).

Ces deux systèmes assurent une dispersion en fonction de la nature des composées aglycones et assurent la séparation des hétérosides en fonction du nombre et nature des sucres.

Les schémas suivants montrent les résultats du contrôle chromatographique :




Résultat de la contrôle chromatographique de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius*.

III.A.4- Méthodes de séparations des produits de l'extrait butanolique :

III.A.4.1- Chromatographie sur colonne (polyamide) :

Une quantité de 12 g de l'extrait butanolique est dissout dans un minimum de méthanol. La solution est introduite sur une colonne confectionnée avec 130g de polyamide préparé dans le toluène. L'élution est faite par de toluène enrichi progressivement de méthanol et c'est la progression des substances en lampe UV qui détermine le changement de polarité de l'éluant. Les fractions obtenues sont rassemblées dans le tableau 1 :

Tableau n°1 : les différentes fractions de la colonne de l'extrait butanolique.

 Numéro de fraction	Eluant	
	Toluène %	MeOH %
f ₁ 1 → 5	100	00
f ₂ 6 → 12	98	02
f ₃ 13 → 20	95	05
f ₄ 21 → 32	90	10
f ₅ 33 → 40	88	12
f ₆ 41 → 47	85	15
f ₇ 48 → 59	80	20
f ₈ 60 → 72	78	22
f ₉ 73 → 84	75	25
f ₁₀ 85 → 93	73	28
f ₁₁ 94 → 103	70	30
f ₁₂ 104 → 110	65	35
f ₁₃ 111 → 120	60	40
f ₁₄ 121 → 130	55	45
f ₁₅ 131 → 140	50	50
f ₁₆ 141 → 150	40	60
f ₁₇ 151 → 160	30	70
f ₁₈ 161 → 172	20	80
f ₁₉ 173 → 186	00	100

III.A.4.2- Chromatographie analytique sur couche mince :

Les fractions obtenues sont analysées par chromatographie sur couche mince dans les systèmes (13/3/3/1), (4/3/3), (8/1/1). Les plaques sont examinées sous UV à 365 nm, les fractions qui présentent la même composition ou présentent peu de différence sont réunies.

Les 19 fractions de cette colonne sont regroupées en 7 lots relativement homogènes.

Le tableau 2 représente les différents lots après regroupement des fractions.

Tableau n°2: les différents lots de la colonne.

<i>Numéro de Lots</i>	<i>Numéro de fraction</i>
Lot F ₁	f ₁ → f ₃
Lot F ₂	f ₄ → f ₅
Lot F ₃	f ₆ → f ₈
Lot F ₄	f ₉ → f ₁₀
Lot F ₅	f ₁₁ → f ₁₂
Lot F ₆	f ₁₃ → f ₁₅
Lot F ₇	f ₁₆ → f ₁₉

A Partir du tableau 2 on obtient 7 nouvelles fractions. Ces fractions sont ensuite analysées par CCM dans les différents systèmes S1, S2, SB, SA. Ces chromatogrammes nous ont permis de sélectionner les bonnes fractions pour la séparation, nous avons choisi alors F₃, F₅, F₇.

III.A.4.3 : Analyse chromatographique des fractions F₃, F₅, F₇.

-Etude de la fraction F₃ :

Cette fraction subit une chromatographie initiale sur plaque de Gel de silice avec le système (8/1/1 : Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau). On obtient après le contrôle sous UV, 2 taches majoritaires de couleur violette N1 et N2.

La séparation de ces deux produits est réalisée alors par ce même système (8/1/1). Le produit N1 est isolé après purification sur colonne de gel de Sephadex LH-20 avec le méthanol comme éluant (28 mg).

-Etude de la fraction F₅ :

Cette fraction subit une chromatographie sur plaques de polyamide avec le système S2 (13/3/3/1).

Le contrôle chromatographique par UV montre un produit M1 bien séparé de couleur violette, avec d'autres composés qui sont un peu voisins, difficiles à séparer par ce système.

Le produit M1 est isolé par ce système puis il subit une purification sur colonne de polyamide avec comme éluant le système MeOH/Toluène (5 / 5), puis une purification finale par le Sephadex en utilisant le MeOH comme éluant.

-Etude de la fraction F₇

Cette fraction subit une chromatographie sur plaques de polyamide avec le système S1(4/3/3). Le contrôle chromatographique par UV montre la présence d'un produit majoritaire L1 bien séparé de couleur violette foncée, avec des produits minoritaires très proches difficiles à séparer par ce système, le produit L1 est alors isolé puis il subit aussi une purification sur colonne de polyamide avec comme éluant le MeOH/Toluène (5 / 5) puis une purification finale par le sephadex en utilisant le MeOH comme éluant.

-Remarque :

Pour la confirmation de la purification de chaque produit une chromatographie bidimensionnelle est réalisée. Les systèmes de cette chromatographie sont : S1(4/3/3) et S2 (13/3/3/1).

- Conclusion:

Dans cette partie expérimentale et par les différents systèmes de la chromatographie, nous avons pu isoler produits flavoniques qui seront identifiés par les méthodes spectroscopiques (UV-visible, RMN-¹H et RMN-¹³C).

Les valeurs de **Rf** de ces flavonoides sont obtenues par plaque CCM dans les systèmes S1(4/3/3), S2(13/3/3/1) et AcOH 15%.

III.A.5 Résultats et discussions :

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'identification des composés flavoniques du *Pituranthos scoparius* basée sur :

Ω- La fluorescence.

Ω- Le **Rf** calculé à partir d'une plaque CCM dans les systèmes S1(4/3/3), S2 (13/3/3/1) et AcOH 15%.

Ω- L'interprétation des séries spectrales UV (décrites dans le Chapitre II).

Ω- Les données spectrales RMN-¹H et RMN-¹³C.

Ω- L'hydrolyse acide qui est utilisée pour déterminer la nature des sucres et leur position.

III.A.5.1 Identification du composé M1 :

- TABLEAU 4 : Données chromatographiques :

Système	SA	S1	S2
Rf	0.37	0.070	0.56
Fluorescence	Violette foncée		

-SA : AcOH 15%

-S1 : 4/3/3, Toluène / Ethanol / Methyléthylcetone

-S2 : 13/3/3/1, Eau / Ethanol / Methyléthylcetone / Acetylacetone

- Données spectrales :

TABLEAU 5 : Spectre UV- visible :

Réactifs	Longueurs d'ondes λ (nm)		
	BI	Autre bandes	BII
MeOH	329.2		273
NaOH	400	333	281.8
AlCl ₃	386	347	278
AlCl ₃ +HCl	385.9	343	278.2
NaOAc	380		282

Spectre du MeOH+ NaOH, après 5 min, stable

- **TABLEAU 6** : Spectre RMN-H :

Le déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7.98	2H	d (8.9)	H2' - H6'
6.93	2H	d(8.9)	H3' -H5'
6.61	1H	s	H3
3.14 – 5.2	-	-	Protons des sucres

-c *L'hydrolyse acide* :

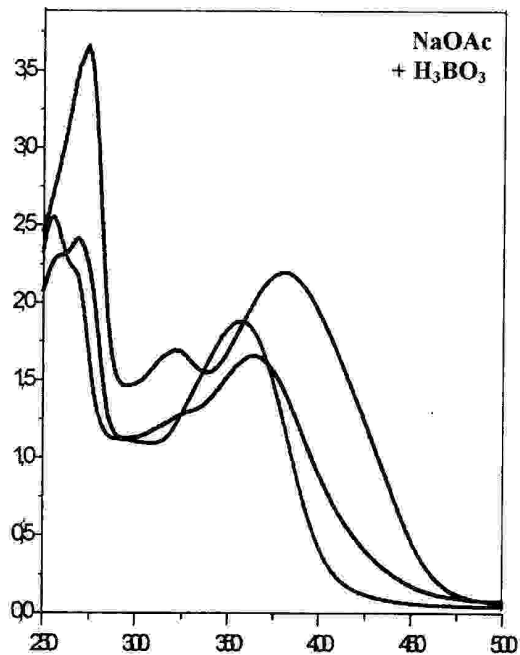
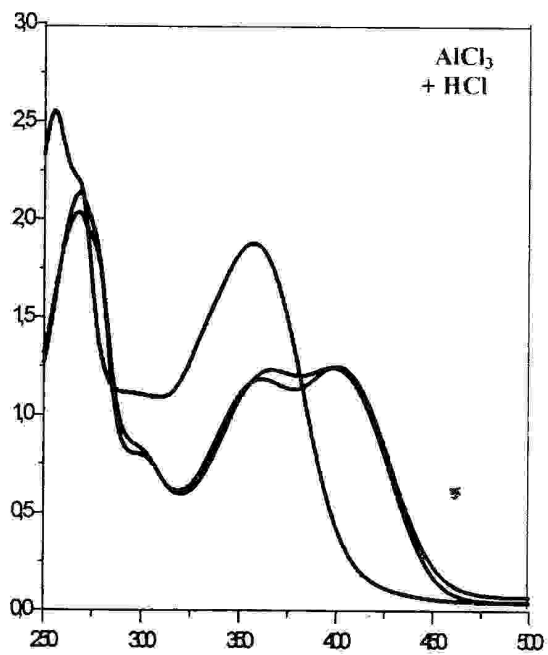
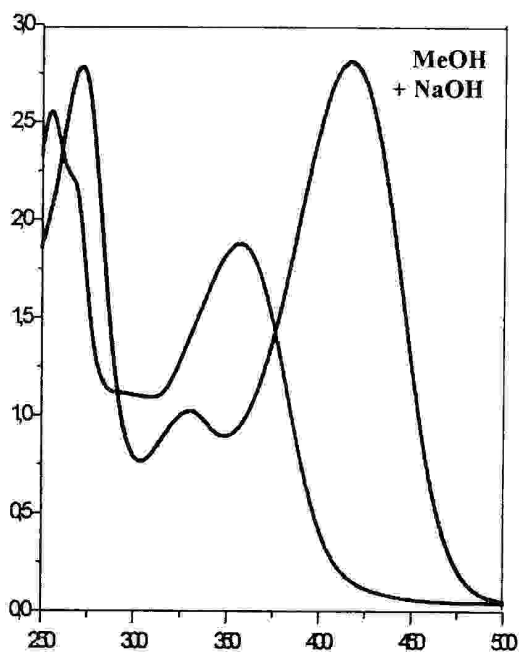
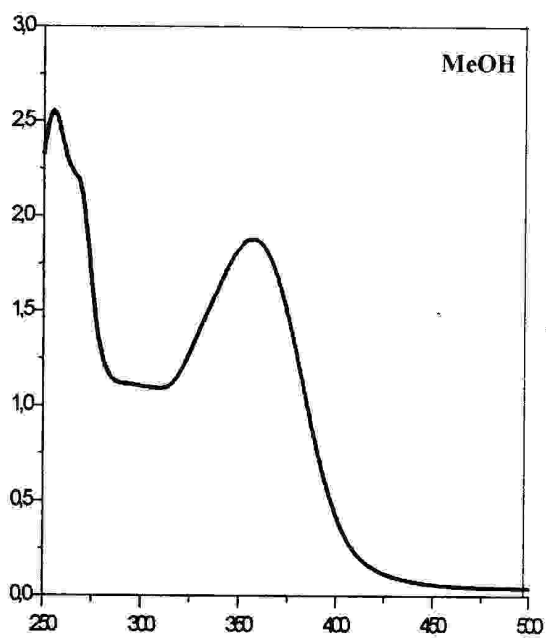
TABLEAU 7 : Résultats du contrôle chromatographique après hydrolyse :

Système	SA	S1	S2
Rf	0.37	0.071	0.55
Fluorescence	Violette foncée		

TABLEAU 8 : Données UV dans le méthanol :

Réactif	BANDE I	BANDE II
MeOH	330	271.5

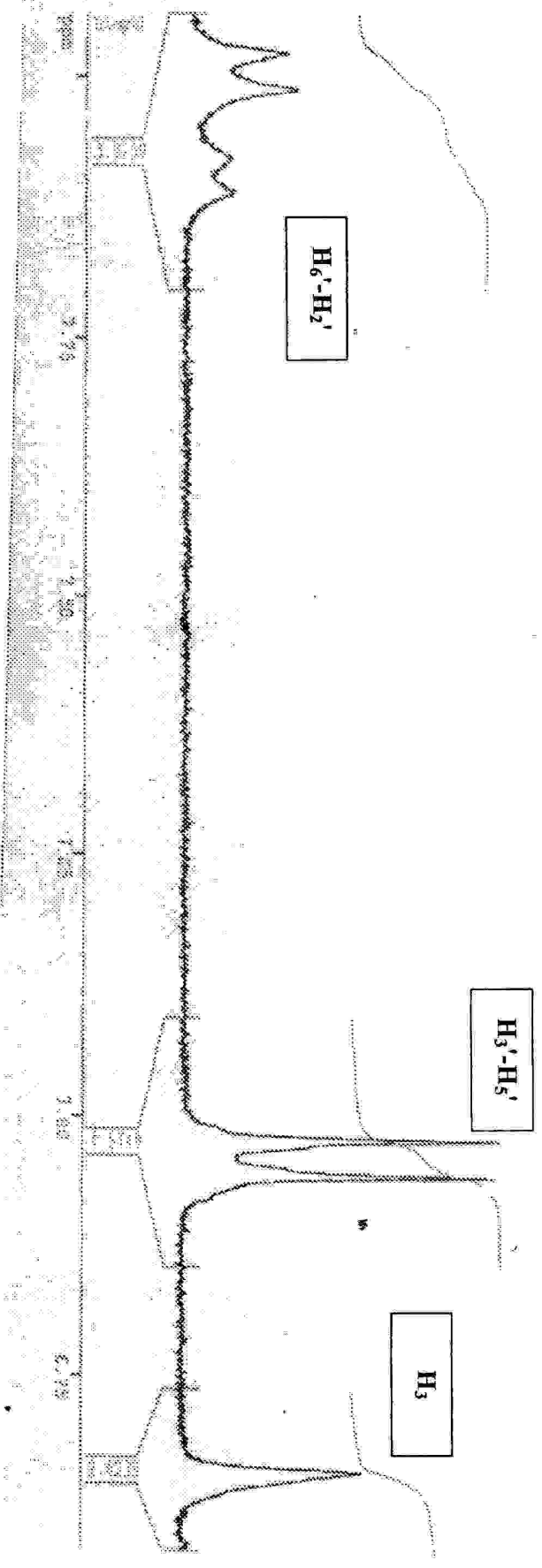
- On remarque qu'après hydrolyse acide, les données spectrales et chromatographiques sont pratiquement inchangées.



Spectre UV du produit M1



Etallement du spectre de RMN du produit M1



-Interprétation :

La valeur de **Rf** de 0.56 dans le système 13/3/3/1 et de 0.37 dans AcOH 15% et à 0.070 dans le système 4/3/3 indique une structure hétérosidique pour le produit M1.

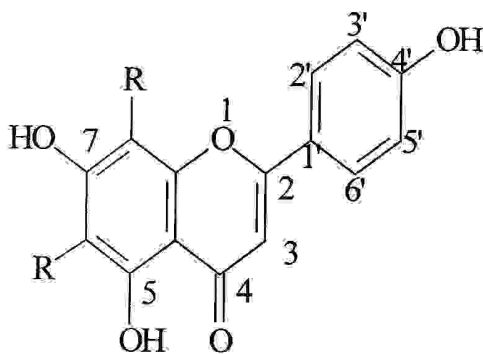
La fluorescence violette foncée et le maximum de la bande BI dans le MeOH à 329.5 nm orienté la structure du composé M1 vers une flavone.

Le déplacement bathochrome de la bande I (BI) de 66 nm après l'addition de NaOH avec une augmentation de la densité optique laisse suggérer un OH en 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à 333 nm montre la présence d'un OH en position 7 et cela est confirmé par l'effet bathochrome (19 nm) de la bande (BII) dans NaOAc par rapport au spectre méthanolique.

L'effet bathochrome (56 nm) de BI dans le spectre AlCl₃/ HCl par rapport au spectre dans le méthanol indique la présence OH libre en 5.

Le spectre dans AlCl₃/HCl ne présente aucun changement notable par rapport au spectre dans AlCl₃ indiquant l'absence du système ortho di -OH. Ces informations permettent de proposer la structure partielle suivante :



La RMN du proton est en parfait accord avec ces résultats et permet de déduire tous les substituants :

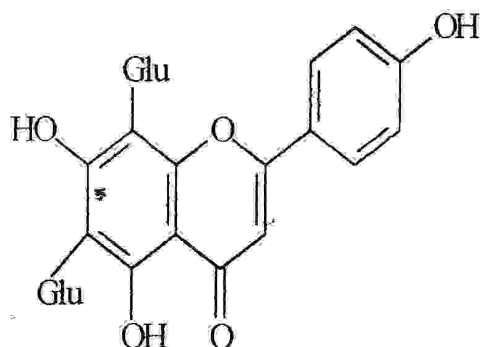
Un signal apparaît à $\delta=7.98$ ppm sous forme de doublet ($J = 8.9$ Hz) correspondant à la résonance des 2 protons équivalents à H_6' et H_2' . On observe également un signal à $\delta=6.93$ ppm sous forme de doublet ($J = 8.9$ Hz) attribué aux protons équivalents H_3' - H_5' .

Le singulet résonant à $\delta= 6.61$ ppm est attribué au proton H_3 .

L'absence des signaux des protons H_6 , H_8 laisse présager la présence de substituants dans ces positions. Les valeurs de R_f suggèrent que ces substituants sont de nature glycosidiques. Ceci est confirmé par l'apparition de signaux entre 3 et 5.2 ppm. L'hydrolyse acide de ce flavonoïde par HCl 4 N à $T= 100^\circ\text{C}$ n'a pas libéré de glycosides. La valeur de R_f et la fluorescence n'ont pas changé, ce qui montre l'absence d'un système O-glycoside en 6 et 8, les liaisons sont donc du type C- glycoside en 6 et 8. Pour confirmer cela nous avons utilisé la chromatographie sur 3 plaques CCM comme suit :

- Plaque 20x 20 recouverte du cellulose avec le système AcOH15% comme éluant.
- Plaque 20x20 préparative recouverte du polyamide avec le système 13/3/3/1 comme éluant.
- Plaque 20x20 préparative de gel de silice avec le système 8/1/1 comme éluant.

L'affrètement de notre produit avec le témoin, (la 6, 8 - di - C - glucosyl apigénine), a donné des taches de même R_f et une fluorescence sous lampe Wood identique. Ceci montre que la structure du flavonoïde M1 est identique à celle du témoin utilisé d'où la structure du flavonoïde M1



6,8 -di -C- glucosyl apigénine (vicenin-2)

III.A.5.2 Identification du composé N1 :

TABLEAU 9 : Données chromatographiques

Système	S1	S2
Rf	0.27	0.45
Fluorescence	Noire violette	

S1 : 4/3/3.

S2 : 13/3/3/1.

- Données spectrales :

TABLEAU 10 : Spectres UV- visible :

Réactifs	Longueurs d'ondes λ (nm)		
	BI	Autres bandes	BII
MeOH	356	329	254
NaOH	412		275
AlCl ₃	396		267
AlCl ₃ +HCl	402		267
NaOAc	382		273
NaOAc+H ₃ BO ₃	372		291
Spectre du MeOH + NaOH, après 5 min, stable.			

TABLEAU 11 : Spectre RMN-H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
3.95	3H	s	-	-OCH ₃
4.50	1H	d	2.0	H1'' (Rha)
5.25	1H	d	7.5	H1'' (Glu)
6.25	1H	d	2.0	H6
6.40	1H	d	2.0	H8
6.92	1H	d	8.5	H5'
7.68	1H	dd	8.5 et 2.0	H6'
7.92	1H	d	2.0	H2'

-c L'hydrolyse acide :

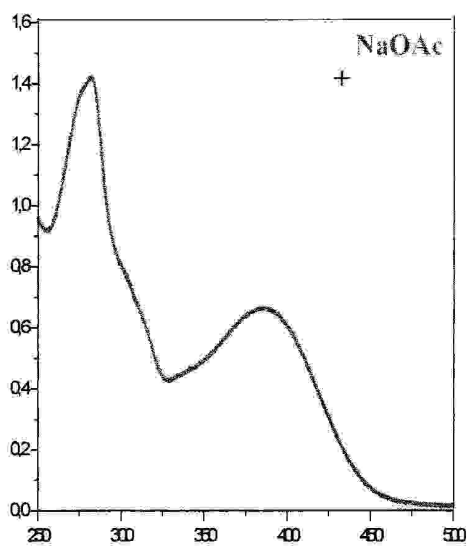
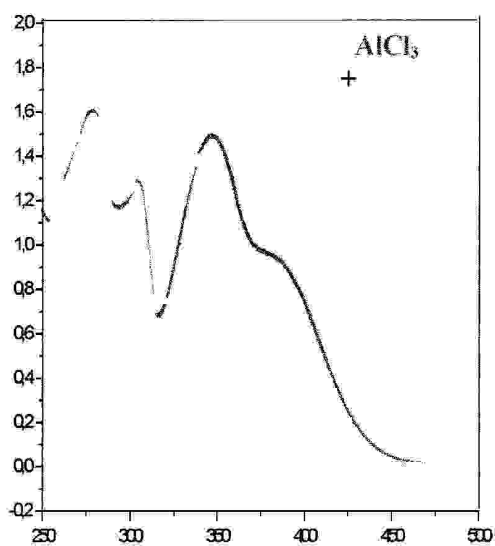
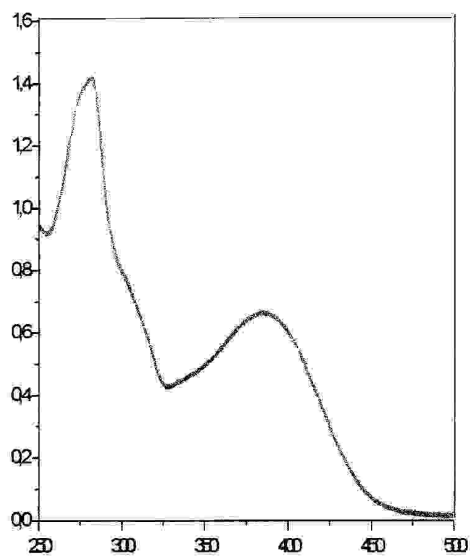
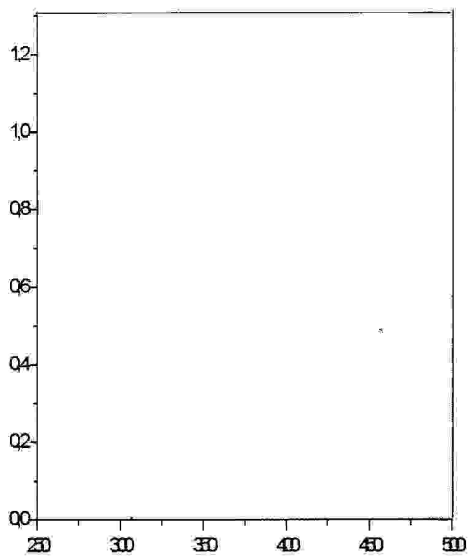
TABLEAU 12 : Résultats du contrôle chromatographique après l'hydrolyse :

Système	SA	S1	S2
Rf	0.37	0.08	0.55
Fluorescence	Violette foncée		

TABLEAU 13 : Données UV dans le méthanol :

Réactif	BANDE I	BANDE II
MeOH	348	271.5

Spectre UV du produit N1



Spectre RMN-¹H du composé N1 enregistré dans le CD₃OD.

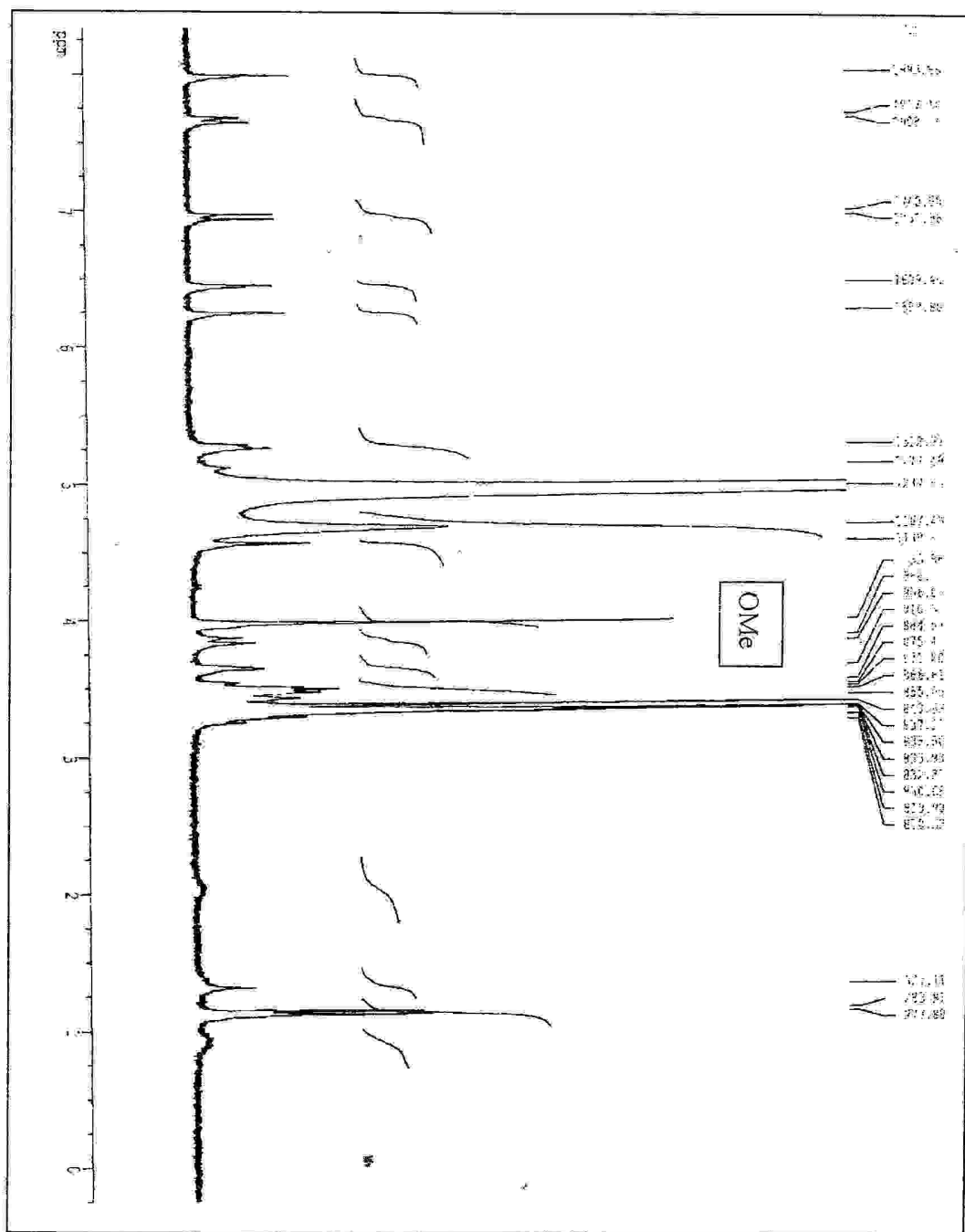
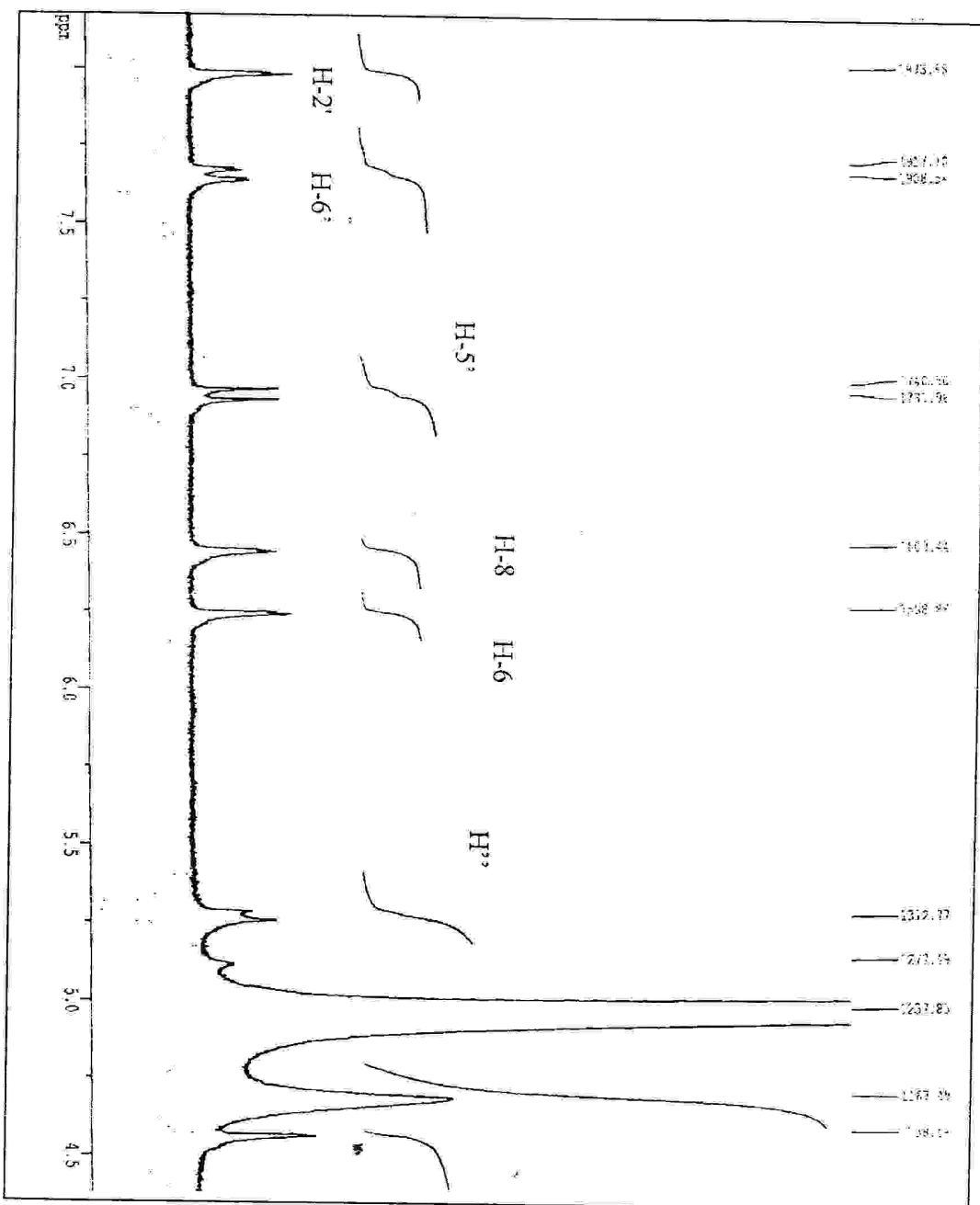


figure -2 -



Etallement du spectre de la composé N1

Interprétation :

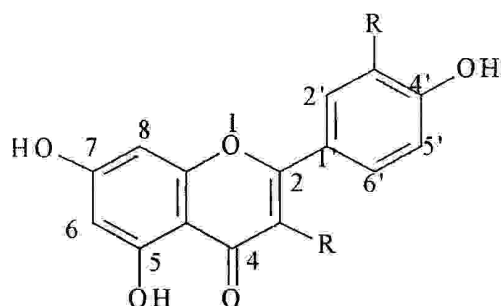
La fluorescence noire violette et le maximum d'absorption de la bande I dans le méthanol (356 nm) indiquent un squelette flavone ou flavanol O- substitué.

Le Rf de 0.27 dans le système 4/3/3 et de 0.45 dans le système 13/3/3/1 indique une structure hétérosidique

Le déplacement bathochrome de la bande I de 56 nm après l'addition de NaOH avec une augmentation de la densité optique, indique la présence d'un OH en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 329 nm montre la présence d'un OH en 7, cela est confirmé par l'effet bathochrome (19 nm) de la bande II dans NaOAc par rapport au spectre méthanolique.

L'effet bathochrome (45) nm de la bande I dans le spectre AlCl₃+HCl par rapport au spectre dans le méthanol montre la présence d'un OH en position 5.

Le spectre dans AlCl₃/HCl ne présente aucun changement notable par rapport au spectre AlCl₃, ce qui exclut le système ortho di-OH. Ces informations mènent à la structure partielle suivante :



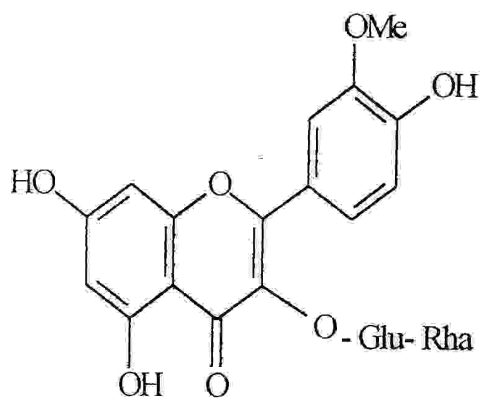
La RMN du proton est en parfait accord avec ces résultats et permet de déduire tous les substituants. L'absence du singulet caractéristique du proton H₃ et l'apparition des signaux de H₂' , H₆' et H₅' sous formes respectives de doublet ($J = 2\text{Hz}$), doublet de doublet ($J = 8$ et 2 Hz) et doublet ($J = 8,5\text{ Hz}$), laisse penser que les positions 3' et 3 sont substituées. L'apparition du signal du groupement méthoxy à $\delta = 3.95\text{ ppm}$ permet de proposer une structure partielle avec un méthoxy en 3' et une partie osidique en 3. Parmi les signaux de la partie osidique, on observe le doublet du proton anomérique H1'' caractéristique du glucose à 5.25 ppm ($J = 7.5\text{Hz}$) et le doublet du proton anomérique H1''' à 4.5 ppm ($J = 2.0\text{ Hz}$) caractéristique du

rhamnose, ces deux sucres occupent la position 3. Les déplacements chimiques montrent que le glucose est lié au rhamnose avec une jonction 1-6 ce qui mène au groupement rutinosyle [26].

L'hydrolyse acide du flavonoïde a conduit au flavonol correspondant confirmant la structure 3-O- sucre et aux sucres glucose et rhamnose identifiées en CCM grâce aux témoins.

Toutes ces analyses spectrales et chromatographiques nous permettent de proposer la structure suivante pour le composé N1 :

5, 7, 4'- trihydroxy- 3'- methoxy- 3-O- rhamnoglucosyl-flavonol.



Ce composé est connu sous le nom de **3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine** [26].

III.A.5.3 Identification du composé L1 :

- TABLEAU 14 : Données chromatographiques

Système	S1	S2
Rf	0.32	0.28
Fluorescence	violette	

S1 : 4/3/3.

S2 : 13/3/3/1.

- Données spectrales :

TABLEAU 15 : Spectres UV- visible :

Réactifs	Longueur d'onde λ max (nm)		
	BI	Autres bandes	BII
MeOH	334		268
NaOH	390	-	269
AlCl ₃	384		276
AlCl ₃ +HCl	382		276
NaOAc	389		267
NaOAc+H ₃ BO ₃	338		268
Spectre du MeOH + NaOH, après 5 min, stable.			

TABLEAU 16 : Spectre RMN-H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
5.20	1H	d	7.5	H1''
6.42	1H	d	2.0	H6
6.78	1H	d	2.0	H8
6.84	1H	s	-	H3
6.95	2H	d	8.9	H3'-H5'
7.96	2H	d	8.9	H6'-H2'

-c Hydrolyse acide

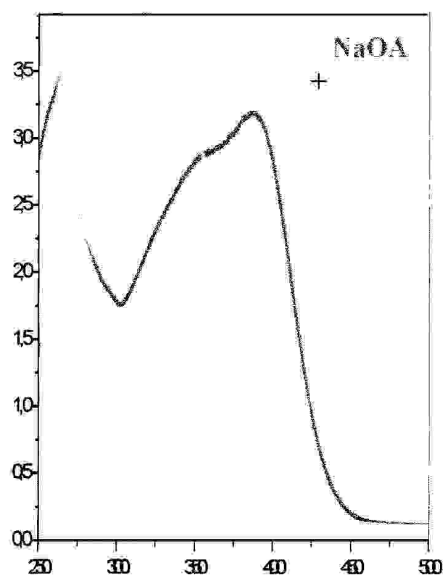
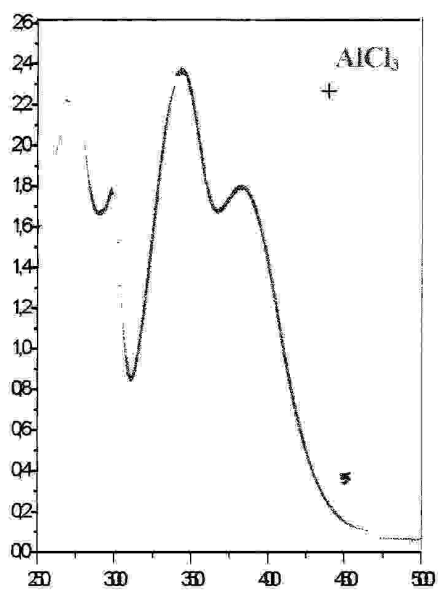
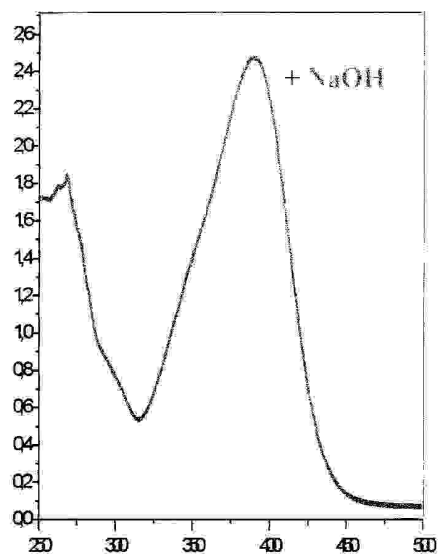
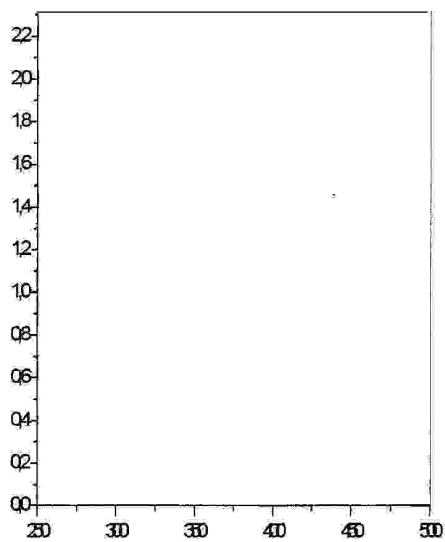
TABLEAU 17 : Résultats du contrôle chromatographique après hydrolyse

Système	4/3/3
Rf	0.65
Fluorescence	Violette

TABLEAU 18 : Données UV dans le méthanol

Réactif	BANDE I λ max (nm)	BANDE II λ max (nm)
MeOH	336	268

Spectre UV du produit L1



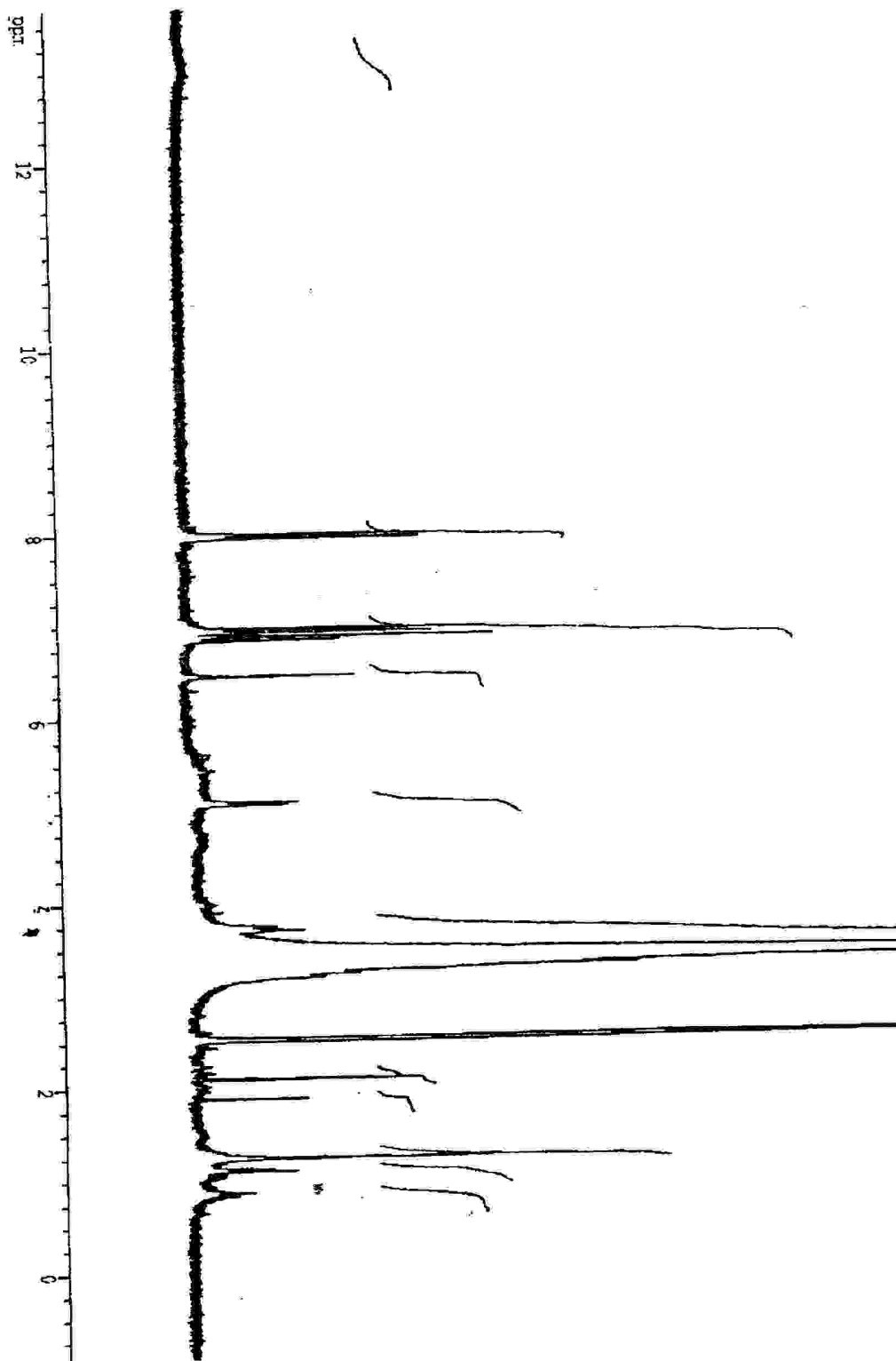
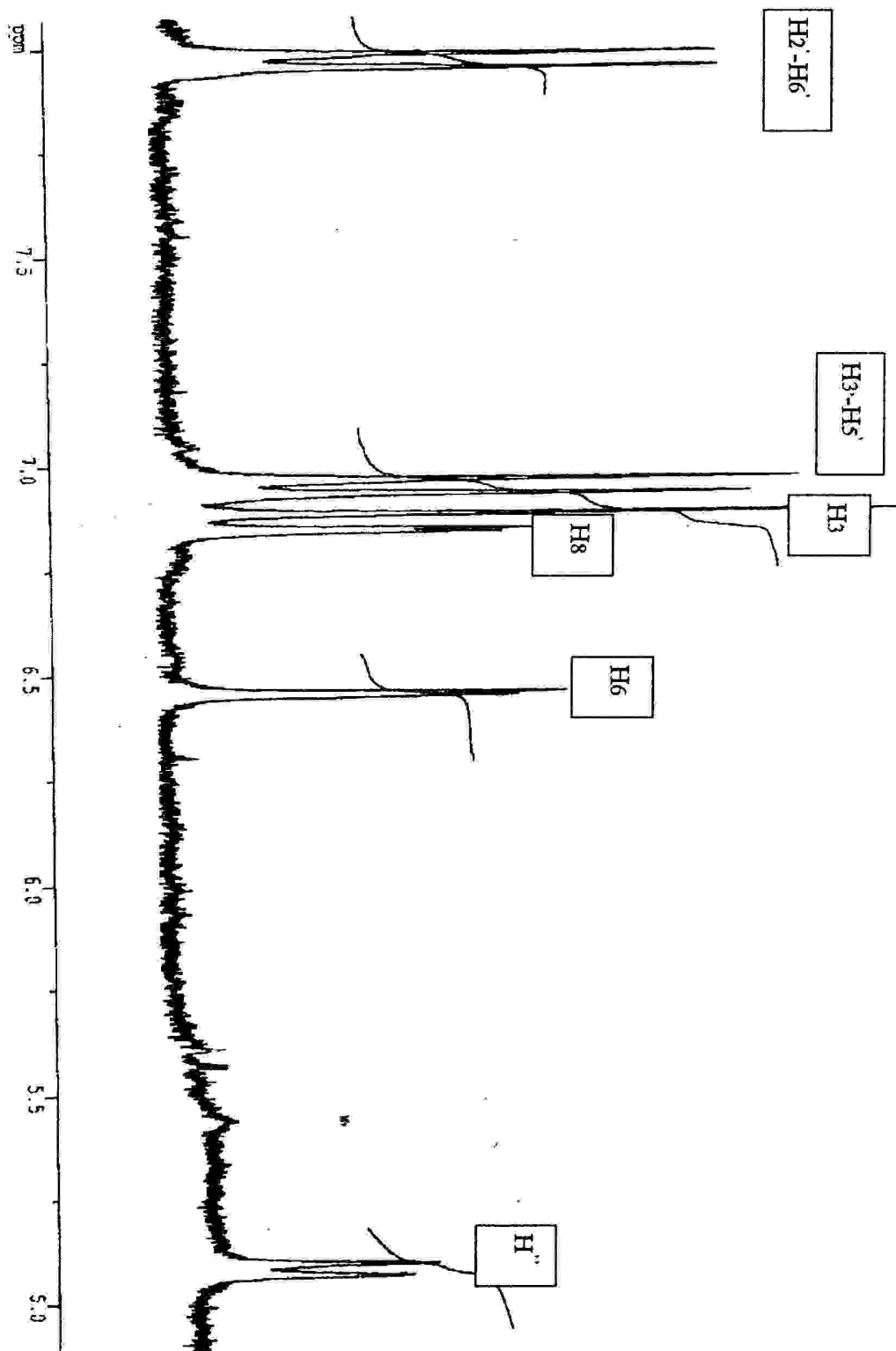


figure -3-

Spectre du composé L1 enregistré dans le DMSO.

Etalement du spectre de produit L1



Interprétation :

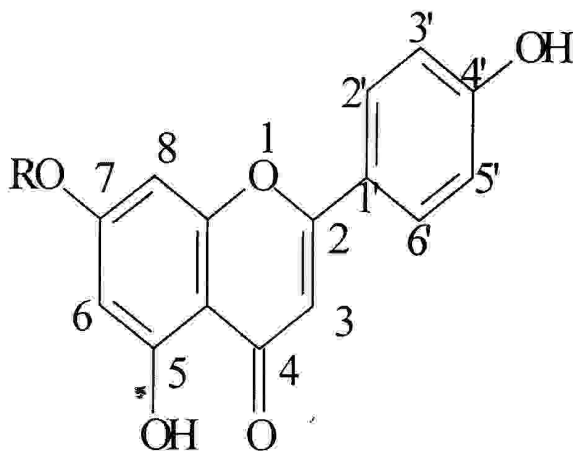
La fluorescence violette et le maximum d'absorption de la bande I dans le méthanol (334 nm) indiquent un squelette flavone.

Le Rf de 0.32 dans le système 4/3/3 et de 0.28 dans le système 13/3/3/1 indique une structure hétérosidique .

Le déplacement bathochrome de la bande I de 56 nm, après l'addition de NaOH avec une augmentation de la densité optique, indique la présence d'un OH en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 nm et 350 nm dans le même spectre (NaOH) indique l'absence d'un OH en position 7 et ceci est confirmé par le faible déplacement de la bande BII ($\Delta\lambda = -1\text{nm}$) dans NaOAc par rapport au spectre dans MeOH, ce qui indique un substituant OR en position 7. L'absence de l'effet hypsochrome de la bande BI dans le spectre dans AlCl_3/HCl par rapport au spectre dans AlCl_3 et l'effet bathochrome faible de la bande BI dans le spectre effectué dans NaOAc/ H_3BO_3 par rapport au spectre dans Méthanol excluent le système ortho di - hydroxylé.

L'effet bathochrome de la bande BI (47 nm) du spectre dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre dans Méthanol indique la présence d'un OH en position 5.

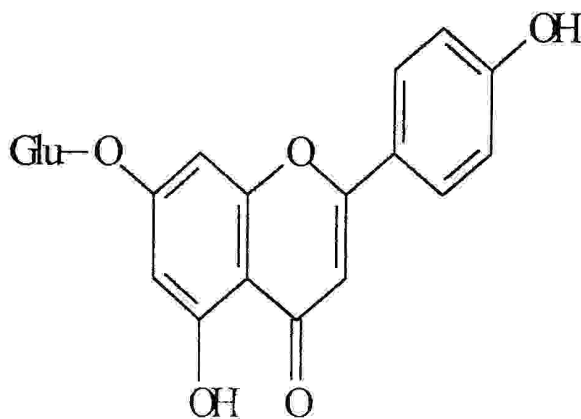
Ces informations permettent de proposer la structure partielle suivante :



Le spectre RMN-¹H dans le DMSO permet d'observer :

- Un signal à 5.20 ppm sous forme d'un doublet ($J = 7.5$ Hz) attribué au proton anomérique H1'' du glucose.
- Un signal à 6.42 ppm sous forme d'un doublet ($J = 2.0$ Hz) attribué à H6.
- Un signal à 6.78 ppm sous forme d'un doublet ($J = 2.0$ Hz) caractéristique de H8.
- Un signal à 6.84 ppm sous forme d'un singulet caractéristique de H3.
- Un signal à 6.95 ppm sous forme de doublet ($J = 8.9$ Hz) attribué aux protons équivalents H5' et H3'.
- Un signal à 7.96 ppm sous forme de doublet ($J = 8.9$ Hz) attribué aux protons équivalents H6' et H2'.

Le glucose a été identifié par l'hydrolyse acide et la chromatographie sur couche mince en présence de sucres témoins. Après concentration de la phase organique, nous avons obtenu une aglycone de fluorescence violette dans le spectre UV dans le méthanol correspond à l'apigénine. Toutes ces analyses spectrales et chromatographiques nous permettent de proposer la structure suivante pour le flavonoïde L1 :



7-O- Glucosyl apigenine (Apigétrine) [27]

Résultat de l'hydrolyse acide pour les trois produits est la suivante:

Résultat de l'hydrolyse acide.

- L'hydrolyse de 0.1mg d'hétéroside par 2 ml d'une solution de HCl (2N) pendant 1 à 2 heures au bain-marie bouillant
- Après refroidissement, l'aglycone est extraite de la solution acide par l'éther et reprise par MeOH, l'aglycone est identifiée par l'UV et par la CCM en présence de témoins et si nécessaire spectrométrie (SM et RMN).
- La phase aqueuse résiduelle est évaporée à sec et reprise par une goutte d'eau pour l'analyse du sucre.
- Une CCM en présences des sucre témoins s'effectue sur plaque de gel de silice imprégnée d'une solution de NaH_2PO_4 (0.2m), l'évolution se faisant dans le mélange acétone/eau 9/1.
- La révélation des sucres se fait par pulvérisation d'une solution de malonate d'aniline. Après séchage de 10Mn à 100°C , Les taches apparaissent brunes dans le visible et jaunes en UV.

Les valeurs de **Rf** de quelques sucres sont résumés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Rf de quelques sucres.

Sucre	Glucose	Galactose	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Ac. Glucoronique
Rf	0.50	0.35	0.82	0.60	0.74	0.84

III.B : Extraction et composition des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* :

Introduction :

Les odeurs que dégagent les plantes sont généralement appréciées de tous, l'on a qu'à penser à la rose et on comprend tout de suite.

A l'époque médiévale, lorsqu'une plante était reconnue pour éloigner les insectes, les gens supposaient qu'elle devait être bonne pour éloigner les insectes à l'intérieur de la maison. A cette époque les gens se doutaient que les insectes pouvaient transporter des maladies très graves [6]. Encore, certaines plantes étaient utilisées pour purifier l'air ambiant que l'on croyait capable de transmettre des maladies.

Les plantes aromatiques se différencient des autres plantes médicinales par leurs principes odoriférants et parfumés appelés : huiles essentielles.

Les huiles essentielles contenues dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles se retrouvent dans les différentes parties de la plante aromatique (feuilles, fleurs..). Elles sont généralement extraites par distillation à la vapeur d'eau sauf pour les essences aromatiques qui sont extraites des agrumes par expression et ne sont donc pas des huiles mais des essences aromatiques.

Nous nous intéressons spécialement à l'analyse (GC et GC / MS) et à l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius*, récolté à Ghardaïa.

III.B.1 : Historique :

La nature, dans sa grande générosité, nous propose une riche palette de plantes pour aider à la guérison. Oubliées pendant de nombreuses années, les huiles essentielles sont redevenues des vedettes en matière thérapeutique.

Les traces d'utilisation de l'aromathérapie remontent à plus de 7000 ans, preuve en est un alambic en terre cuite retrouvé au Pakistan datant de cette époque. On trouve des inscriptions datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits égyptiens datant de 3500 ans. Les Romains utilisaient également les huiles essentielles. Mais la grande épopée des huiles essentielles débute au 15ème siècle jusqu'en 1935, date à laquelle elles furent reléguée en arrière plan avec la découverte de la pénicilline... A noter qu'aucun parfumeur n'a jamais été soumis à une quelconque contamination [6].

Le terme aromathérapie vient du professeur français RENE-MAURICE GATTEFOSS [7], un chimiste qui a utilisé l'huile essentielle de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner les blessures et les infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque.

C'est VALNET qui en 1970 [6] va relancer l'utilisation thérapeutique des huiles essentielle avec ses débats et son livre qui est maintenant dépassé vu les expérimentations et recherches effectuées depuis, avec les moyens modernes à notre disposition.

En 1990 la médecine aromatique qui sera renommée ainsi par l'auteurs D. PENOEL [8] hérite d'un livre complet et toujours référence "L'aromathérapie exactement" comprenant les chémotypes et indications thérapeutiques référant à des bases scientifiques.

III.B.2 : Définition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux [9].

Aussi, la norme AF[^]NOR NF-75-009 a donné la définition suivante d'une huile essentielle : C'est un produit obtenu à partir d'une matière végétale soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation à sec.

Ensuite, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

□-Localisation d'une huile essentielle de la matière végétale :

Les huiles essentielles se trouvent dans des glandes minuscules situées dans les différentes parties de la plante aromatique [9].

- Dans les feuilles comme pour le basilic.
- Dans les fleurs comme pour la rose.
- Dans les fruits comme pour le citron.
- Dans les graines comme pour le coriandre.
- Dans l'écorce comme pour la cannelle.
- Dans les racines pour certaines plantes.

Les huiles essentielles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles.

Si l'on écrase la feuille (ou partie concernée) d'une plante aromatique, des petites poches vont se briser laissant s'échapper la substance aromatique. C'est pour cette raison que la récolte se fait au meilleur moment en fonction des substances que l'on veut extraire et des conditions extérieures (climat, période de l'année...), car la plante ne développe pas les mêmes composants selon la période de l'année.

III.B.3 : Propriétés fondamentales des huiles essentielles :

III.B.3.1 : Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées, leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé, solubles dans les solvants organiques usuels [9], elles sont liposolubles, entraînaibles à la vapeur d'eau.

En ce qui concerne leurs propriétés chimiques [10], les huiles essentielles sont constituées de différents composants : Terpènes, aldéhydes esters, cétones, lactones... Dans le tableau 19 figurent quelques propriétés biologiques et thérapeutiques des familles biochimiques constituant les huiles essentielles :

TABLEAU 19 : PROPRIETES THERAPEUTIQUES DES FAMILLES BIOCHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES [10].

Familles biochimiques	Propriétés biologiques et Thérapeutiques
Monoterpènes	Stimulants du système immunitaire. Action révulsive sur la peau, utiles en cas de douleurs localisées: ils sont donc antalgiques à action percutanée. Leur utilisation doit être limitée dans le temps sinon ils deviennent dermocaustiques et agressifs pour les muqueuses.
Monoterpénols	Composés anti-infectieux ; bactéricides, virucides et fongicides à utiliser parallèlement aux phénols selon les cas lors d'infections ; également excellents immunostimulants. Moins violents que les phénols, ils sont de remarquables toniques généraux, plus spécifiquement neurotoniques. Moins hyperthermisants et hypertensifs, ils n'ont pas leur toxicité : non dermocaustiques, non hépatotoxiques.
Sesquiterpènes	Légèrement hypotenseurs, calmants et anti-inflammatoires. Les azulènes sont spécifiques donnant une couleur bleue sombre aux huiles essentielles; Excellents anti-inflammatoires.
Sesquiterpénols	Bons toniques et stimulants généraux, ils sont peu anti-infectieux mais surtout immuno-stimulants. Les huiles essentielles contenant des sesquiterpénols agissent principalement sur le terrain des individus.

Phénols	Fortement anti-infectieux et immuno-stimulants. Ils agissent en hyper : hyperthermisants, hypertensifs. Toniques à faible dose ils deviennent excitants à dose plus élevée. Les phénols doivent être utilisés prudemment et temporairement car ils sont irritants pour les muqueuses et hépato-toxiques à dose forte et répétée. Sur la peau les phénols sont irritants et dermocaustiques ; toujours les utiliser dilués sur une huile végétale.
Diterpénols	Régulateurs hormonaux en raison de leur structure voisine des hormones stéroïdes sexuelles humaines ; ils sont actifs même à faible dose.
Aldéhydes	Intermédiaires entre alcools et cétones. Ce sont surtout de bons anti-inflammatoires, ils agissent en hypo : calmants du système nerveux, hypothermisants et hypotenseurs. Toniques, anti-infectieux, ils peuvent irriter les muqueuses et la peau.
Acides	Les composés les plus anti-inflammatoires du règne végétal ; ils sont hypothermisants, hypotenseurs. On les trouve principalement sous forme d'esters, c'est-à-dire combinés à des alcools.
Cétones	Composés très actifs physiologiquement, leur utilisation doit être bien contrôlée sinon elles deviennent rapidement toxiques. A faible dose, les cétones agissent en hypo : elles sont calmantes, sédatives, hypothermisantes. A forte dose ou doses répétées elles sont neurotoxiques, stupéfiantes et épileptisantes, voire abortives. Bon pouvoir de lyse sur les mucosités et les lipides, empêchent le sang de former des caillots (anticoagulantes) et activent le processus de cicatrisation. Faiblement antiseptiques mais fortement immuno-stimulantes, elles ont en plus des propriétés vermifuges et anti-mycosiques. Il ne faut jamais les employer seules, ni à haute dose, ni sur de longues périodes.
Esters	Allient les propriétés calmantes des cétones aux propriétés toniques des alcools d'où leurs propriétés anti-spasmodiques et neurotoniques. Excellents rééquilibrants nerveux (antidépresseurs psychiques). Les esters sont très doux sur la peau et décongestionnent en cas de manifestations inflammatoires. On les utilise souvent car ils présentent peu de dangers.

Oxydes	Décongestionnants broncho-pulmonaires: mucolytiques et expectorants. Propriétés assez spécifiques selon leur formule biochimique propre. Nombreux oxydes toxiques: stupéfiants (anethol), neurotoxiques et hépatotoxique (ascaridol), convulsivants (apiol et myristicine).
Coumarines	Neuro-sédatives, anticoagulantes. Action en hypo : hypothermisantes, hypotensives. Les furocoumarines ne doivent pas être utilisées sur la peau avant l'exposition au soleil car elles sont photosensibilisantes. Les pyranocoumarines sont hépatotoxiques. Tout dépendra de la proportion et des autres composants qui viendront tempérer ou équilibrer l'essence. Par exemple : <i>Lavandula vera</i> contient des cétones et des coumarines en faible proportion, qui sont "neutralisées" par les esters aux propriétés relaxantes très importantes.
Lactones	Agissent en hypo : hypothermisantes. Elles ont une action mucolytique plus puissante que les cétones.
Diones	Antispasmodiques et anticoagulantes. Elles sont moins toxiques que les cétones.

III.B.3.2 : Comment définir une huile essentielle :

- On donne le nom de l'espèce en latin [10].

lavandula officinalis = lavande officinale,

lavandula vera = lavande vraie, à l'odeur plus fine

- En précisant la partie ou organe dont est tirée l'huile essentielle (racines, feuilles, fleurs, graines..).

- En précisant sa distillation à la vapeur d'eau, ou son extraction

- En précisant le chemotype ou principe actif caractéristique qui donne les effets physiologiques majeurs.

Exemple : les thymus du constantinois [25] sont plus riches en phénols (thymol et carvacrol) donc plus efficaces.

Mettant en relief, l'harmonie, le plaisir et la remarquable complémentarité entre monde végétal aromatique et monde humain [10], les Anthroposophes de RUDOLF STEINER résument l'action des plantes selon l'ordre suivant:

- les racines agissent sur le système nerveux.
 - les graines et fleurs sur le système digestif total.
 - les feuilles sur la respiration et le cœur.
- D'ou l'intérêt de connaître la partie de la plante utilisée.

III.B.3.3 : Rôle et intérêt thérapeutiques des huiles essentielles :

III.B.3.3.a :Rôle physiologique :[11][9]

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui mis en lumière par le progrès scientifique :

1 - Propriété antiseptique :

C'est-à-dire microbicide (tue microbes et virus pathogènes) [12]. Elles s'affirment par endroit supérieur aux "antibiotiques" classiques parce qu'elles ont une action bactériolytique [12].

2.- Propriété de défloculation :

Les huiles essentielles sont défloculantes (solvants). C'est-à-dire qu'elles "lysent" collent aux mucosités visqueuses en cristallisant (noyaux durs issus des métabolismes et engendrés par les excès de viande et d'amidons, causes profondes de la plupart des maladies) [13].

3.- Propriété de diurèse :

L'huile essentielle fait fonctionner les 4 grands émonctoires (peau -avec ses 3 glandes-, reins, poumons et intestins), facilitant le drainage des déchets et résidus humoraux solubles et insolubles vers leurs émonctoires spécialisés.

4.- Pouvoir osmotique :

Les huiles essentielles sont employées en cosmétique, en kinésithérapie et en balnéothérapie. Les huiles essentielles utilisées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes dues à leurs activités physico-chimiques, et à leur action vasomotrice. Ce pouvoir osmotique s'exerce pleinement sur le système respiratoire, par la pénétration dans la voie pulmonaire au moyen de brouillard micronisé.

Il apporte ainsi une voie originale de désinfection [7]. Ainsi, dans cette même utilisation pulmonaire, la recherche fondamentale aux USA met en évidence l'intérêt de certaines chaînes aromatiques agissant sur le mental (relaxation, excitation..) et sur l'organisme en général [12].

5.-Le pouvoir bioélectronique :

Il a été mis en avant par L.C VINCENT avec ses 3 mesures fondamentales qui sont recherchées dans les 3 liquides humoraux : Sang, salive, urine [14].

- Le pH ou mesure acido-basique Pour les huiles essentielles est presque toujours acide, ce qui contrarie le développement pathogène évoluant toujours dans des valeurs basiques (7 à 14).
- L'oxydoréduction : ce paramètre indique la tendance ou non des cellules à s'oxyder et donc à former des radicaux libres. Or, les huiles essentielles sont presque toujours dans des valeurs réductrices s'opposant à l'oxydation (0 à 28).
- La résistivité ou résistance ionique, les huiles essentielle ont des taux très élevés de ce facteur (résistance) [14].

III.B.3.3.b Rôle thérapeutique :

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, agissent sur la personne dans sa globalité [15-16].

les huiles essentielles possèdent des propriétés thérapeutiques variées :

- Remédient aux problèmes respiratoires.
- Diminuent la tension nerveuse [17].
- Améliorent la circulation sanguine.
- Aident le corps à traiter les impuretés.
- Soulagent la nervosité et les douleurs rhumatismales.

Il semble que les huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiques ont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle biologique de ces huiles (inhibiteurs des germination et protecteurs les plantes des prédateurs -insectes, champignons [8]).

#- Précautions d'emploi :

La puissance des huiles essentielles végétales est très grande, dû fait de leur concentration extrême [18]. L'utilisateur doit donc prendre des précautions élémentaires, avant tout emploi, particulièrement en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe.

- A fortes doses, les huiles essentielles de sauge, d'hysope de romarin et de thym peuvent être épileptisantes.
- Les huiles essentielles de marjolaine et de lavande ont des propriétés hypotensives, à ne pas utiliser si on a déjà une tension artérielle faible [19].
- Chez la femme enceinte, certaines huiles essentielles, les emménagogues, peuvent induire des troubles sérieux ou des contractions.
- Les huiles essentielles de romarin et d'hysope ont des propriétés hypertensives, à ne pas utiliser en cas de tendance à l'hypertension artérielle.

- Les huiles essentielles utilisées en bain [17] sont en général les suivantes : Eucalyptus, Marjolaine, Sauge, Romarin, Lavande, Géranium. Lors de l'utilisation il faut toujours ajouter une tasse de sel de mer avec 30 gouttes de l'huile par bain, le sel de mer sert à neutraliser les terpènes des huiles essentielles.

-Certaines huiles essentielles utilisées en thérapie :

les huiles essentielles sont largement utilisées en thérapie, les activités thérapeutiques les plus répandues dans les huiles essentielles sont résumées dans le tableau 20.

NB : L'utilisation des huiles essentielles doit être en faibles quantités, généralement quelques gouttes lors d'un massage et souvent mélangées avec une huile de base comme l'huile d'amande douce.

Tableau 20 : Certaines huiles essentielles et leurs utilisations thérapeutiques [19].

Huile Essentielle De la plante	Utilisation thérapeutique
<i>Basilic</i>	diminue l'anxiété, améliore la concentration de la digestion, soulager les maux de tête.
<i>Camomille</i>	Contre la dépression et les insomnies, soulager les problèmes digestifs et différent problèmes de peau.
<i>Citron</i>	Améliore la circulation, soulage les problèmes respiratoires
<i>Coriandre</i>	Soulage la nervosité et les douleurs rhumatismales, améliorer la digestion
<i>Eucalyptus</i>	Soulage les rhumes, problèmes respiratoires, les douleurs.
<i>Fenouil</i>	Améliore la digestion, soulage la constipation et les nausées, les graines sont galactogènes.
<i>Jasmin</i>	Soulage les dépressions, les problèmes respiratoires, normalise la circulation et améliore la digestion.
<i>Lavande</i>	Soulage les insomnies, les indigestions , les maux de tête, les douleurs musculaires.
<i>Marjolaine douce</i>	Diminue la tension nerveuse, la pression artérielle, les insomnies, soulage les rhumes.
<i>Menthe poivrée</i>	Soulage la fatigue, les irritations cutanées.
<i>Pin</i>	Aide aux problèmes avec les reins, soulage les problèmes respiratoires.
<i>Rose</i>	Soulage les stress, soulager les maux de tête.
<i>Romarin</i>	Soulage la fatigue, les douleurs musculaires, les problèmes respiratoires
<i>Sauge</i>	Soulage la fatigue, les problèmes respiratoires, améliorer la pression artérielle
<i>Thym</i>	Soulage la fatigue, les dépressions, les maux de tête, les douleurs musculaires, améliorer la circulation.
<i>Gingembre</i>	Problème d'ordre glandulaire et enflure lymphatique.
<i>Pituranthos scoprius</i>	Utilisé comme remède contre certaines douleurs musculaires, contre le rhumatisme et la fièvre [23].
<i>Pelargonium</i>	Aider aux système nerveux, améliorer la digestion.

III.B.4 : Procédés d'obtention :

L'extraction semble assez complexe et coûteuse d'où le prix élevé des huiles essentielles. La plupart des huiles sont produites par distillation ou par enfleurage (méthode par contact avec une matière grasse) [9].

La distillation à la vapeur d'eau est le procédé le plus ancien. Pour être distillées, les plantes aromatiques sont placées dans un alambic ; sous l'action de la chaleur, l'eau devient à l'état vapeur et entraîne les molécules aromatiques contenues dans les plantes [9]. Ce mélange passe dans un serpentin de refroidissement.

A la sortie, un vase florentin sépare l'huile essentielle de l'eau; l'huile étant plus légère (en général) reste à la surface, l'eau aromatique ayant servi à la distillation est séparée de l'huile ; elle s'appelle hydrolat ou eau florale et contient moins de 5% d'huile essentielle.

#-Remarque :

Le rendement de la distillation dépend de chaque espèce et peut être parfois extrêmement faible , ce qui justifie le prix élevé des huiles essentielles.

Ainsi, par exemple pour une tonne de plante fraîche, on peut avoir [6] :

- 20 Kg d'huile pour l'*Eucalyptus*.
- 10 Kg d'huile pour la lavande.
- 3 Kg d'huile pour la Marjolaine.
- 1 Kg d'huile pour le Thym.
- 200 grammes d'huile pour la Camomille.
- 3 grammes d'huile pour la Rose de Damas.

III.B.5 : Méthodes et procédés d'identification :

Pour chaque huile essentielle, l'identification des principaux constituants se fait par chromatographie sur couche mince et par chromatographie en phase gazeuse.

Pour la chromatographie sur couche mince on utilisait comme solvants les mélanges : Benzène-éther isopropylique et Benzène -Acétate d'éthyle. La révélation des taches s'effectue par pulvérisation de vanilline sulfurique et passage à l'étuve pendant 10 mn à 100C°[20]. La chromatographie en phase gazeuse permet une évaluation qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. On utilise des colonnes traditionnelles, remplies avec des phases diversement imprégnées (ex : 5% de polyéthylène glycol ou Carbowax) [20].

Les séparations les plus fines sont obtenues avec des colonnes capillaires.

#- Chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, les premières applications ont concerné le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole [21]. Son développement, est du à son extrême sensibilité, sa polyvalence, la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou des solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. Les phases stationnaires commerciales sont assimilés généralement à des liquides. Le développement de la chromatographie à grande vitesse ou multidimensionnelle rend cette technique toujours plus attractive.

Schématiquement, un appareil CPG comprend trois modules spécifiques [21] : un injecteur, une colonne et un détecteur réunis dans un bâti unique. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits contrôlés avec précision permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

Pour la phase stationnaire il y a 4 paramètres opérationnels :

- L- longueur de la colonne.
- U- vitesse de la phase mobile.
- T- température de la colonne.
- B- rapport de phase.

III.B.6 : Identification des composés des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* :

Le but de ce travail est l'extraction puis l'analyse des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius*. L'analyse est réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse (GC) et la GC/MS [22].

III.B.6.1 : Matériel végétal et extraction des huiles essentielles :

La plante endémique *Pituranthos scoparius* a été collecté à Ghardaïa au mois d'Avril 2003, elle a été séchée à l'ombre.

-Méthodes d'extraction :

Nous avons utilisé l'hydrodistillation à l'aide d'un Clevenger, selon la pharmacopée anglaise.

a- Extraction des tiges :

200g de tiges de *P. scoparius* sont hydrodistillés dans un Clevenger. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur la surface du serpentín formant deux phases, la phase inférieure, celle de l'eau et la phase supérieure de densité plus faible et de coloration jaune, celle de l'huile essentielle.

Après 3 heures d'extraction on récupère 1g d'une huile jaune fortement odorante le rendement est de 0.1%.

b- Extraction des graines

L'hydrodistillation de 130g des graines a permis de récolter 1g d'une huile jaune aussi fortement odorante (0.7%).

III.B.6.2 Les conditions analytiques :

Après extraction, chaque huile a été analysée par GC et GC/MS. L'analyse a été réalisée sur un appareil Perkin-Elmer 6890 équipé de 5 colonnes capillaires, couplé à un spectromètre de masse (Hewlett packard 5973). Le gaz éluant étant l'hélium, la chromatographie gazeuse est réalisée avec un débit de 20 ml/mn et les conditions chromatographiques sont [22] :

- l'éluion des produits se fait dans une colonne capillaire de 25m de long et de 0.25mm de diamètre et de 0.25 μ m d'épaisseur.
- La température initiale étant de 50°C pendant 5mn, puis on augmente la température jusqu'à 270°C° avec un palier de 3C°/mn.
- Pour chaque échantillon, l'analyse a été effectuée par Impact électronique (70ev), et par ionisation chimique on utilise le méthanol étant le gaz ionisé .

- Identification des composés :

L'identification des composés de chaque huile essentielle a été faite grâce à leurs temps de rétention et par comparaison informatique de leurs spectres de masse avec les spectres des librairies WILEY 275 et NIST [28] et en utilisant les données de la littérature.

Les pourcentages sont déterminés par GC-EIMS.

Les résultats de l'identification sont figurent dans le **Tableau 21** :

28.681	β -Cubébène	0.20	0.61
28.783	β -Elémène	0.01	0.22
29.407	Méthyl eugénol	1.60	5.87
29.828	β -Caryophyllène	0.95	1.74
30.3	Epibicyclophellandrène	0.08	0.64
30.62	Aromadandrène	/	0.11
31.193	α -Humulène	0.09	0.73
32.39	Germacrene D	1.04	12.73
32.542	β -Selinène	0.29	0.90
33.115	Bicyclogermacrène	/	2.71
33.233	α -Muuroène	0.06	0.15
34.093	Myristine	11.12	7.17
34.228	δ -Cadinène	2.56	2.30
34.497	1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-diméthyl-4-(1-méthylethyl)Naphthalène.	/	0.16
34.682	α -Cadinène	0.03	0.07
34.817	α -Calacorène	0.08	0.12
35.526	Elemicine	0.20	0.25
36.2	Spathulénol	2.54	4.49
36.368	Oxide de Caryophyllène	0.70	0.60
38.341	Dill apiole	12.20	1.07
38.83	T-Muurulol	1.16	3.62
39.032	β -Eudesmol	1.60	4.11
43.263	Acide myristique	/	0.30
49.887	Acide palmitique	/	0.57

Totale :

Monoterpenes non oxygénés	40.33	37.68
Monoterpenes oxygénés	4.54	2.78
Sesquiterpenes non oxygénés	5.95	25.90
Sesquiterpenes oxygénés	6.00	12.82
Dérivés du phenyl propane	25.12	14.36
Acides gras	/	0.86
Hydrocarbures oxygénés	0.92	0.02
Dérivés aromatiques monoterpéniques	6.57	0.92

III.B.6.3 : Discussion des résultats :

Les analyse GC et GC/ MS et les donnes de la bibliothèque NIST et WILEY basées sur les temps de rétention de chaque composant on permis d'identifier les composants de chaque huile (*tableau21*).

Les composants de chaque huile sont essentiellement des monoterpènes non oxygénés. L'huile essentielle des tiges est majoritairement composée de : germacrène D (12.73%), limonène (9.78%), α -phellandréne (7.11%), α -pinène (6.81%), et de méthyl eugénol (5.87%) tandis que les principaux composants de l'huile essentielle des graines sont le dill apiol (12.20 %), le limonène (11.17%), la myristine (11.12%), l' α -pinène (8.16%), le β -cymène (7.46%) et le thymol (5.88%).

Les pourcentages remarquablement respectifs différents en germacrène D , dill apioll et en thymol (12.03% , 1.07% , 0.14%) pour les tiges et (1.04% , 12.20% , 5.88%) pour les graines, laissent présager des différences d'activité antiparasitaire.

Il faut noter également les pourcentages comparables en α -pinène et limonène respectivement trouvés dans l'huile des tiges (6.81%, 9.78%) et dans l'huile des graines (8.16%, 11.17%).

Bibliographie

- [1] QUEZEL, P., SANTA, S. (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions Désertiques Méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris, France.
- [2] LEBRETON, P et COLL. (1967). *Chim. Anal*, 49 (7), 375-383.
- [3] BOUTARD, B. (1972). *Thèse de doctorat de spécialité (3^{ème} cycle)*, Lyon.
- [4] GONNET, J.F., JAY, M., VOIRIN, B., LEBRETON, P. (1973). Récent développement dans l'analyse des aglycones flavoniques. Assemblée générale du "Groupe Polyphénols", Lepont de la Morge, Suisse.
- [5] JAY, M et COLL. (1975). *Phytochemistry*, 14, 1607-1612.
- [6] Site Internet : Médecines naturelles.com
- [7] GATTE FOSSE, M. (1990). : Aromathérapie 2^{ème} congrès international des huiles essentielles grasses.
- [8] PONOEL, D. Urgences et soins intensifs en médecine aromatique intégrée. 255-259. Lavoisier (France)
- [9] BRUNETON, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation, 2^{ème} édition. Lavoisier (France), 422-266.
- [10] HOUCHIT, J. (1992). Pharmacie naturelle, Ed. Aubanel.
- [11] BHASKARA, R. M.V et COLL. (1998). Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 47 (8), 1520-1515.

- [12] BEZAGER, L et COLL. (1992). Les plantes dans la thérapeutique moderne, 6^{ème} édition, Ed. Maloire. 4200
- [13] BERNADET, M. (1983) . Phyto-aromathérapie pratique . Ed. Masson, 89-78.
- [14] CRETTI, L. (1981). Les plantes aromatiques médicinales, Ed. Atlas. 68-15.
- [15] ORANGES, R., PASSET, G., TEULADE. (1973) . Les plantes médicales à essences et chimiotaxonomie, 17^{ème} journée de l'aromate lourd, 12 mai 1973
- [16] ABRASSART, J. L. (1992). Guide pratique d'aromathérapie : usages et biens faits des huiles essentielles des plantes. 95-98. Ed. Masson
- [17] LEMIRE, N. (2000). Gazette thérapeutes, 26-30, Ed. Atlas.
- [18] BAUDOUX, D. (2000). L'aromathérapie; se soigner par les huiles essentielles. 58-59, Ed. Maloire
- [19] PARIS, M., HURABIELLE, M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Tome I. Ed. Masson (Paris, New York).
- [20] HURABIELLE, M. (1981). Abrégé de matière médicale pharmacognosie tome I (généralités-monographies), Masson 193-194.
- [21] PROUËSSA, F., ANNICK., R. (2000) . Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, 5^{ème} édition , Dunod (Paris) 30-29.
- *
- [22] VERITE, P., NACER. A., KABOUCHE, Z., SEGUIN., E. (2004). Composition of seeds and stems essential oil of *Pituranthos scoparius*.
- *
- [23] AL.KADI, A. A. (1989). Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en lybie Vol 1-2.

- [24] REYNAUDE, J. (1984). Etude botanique et chimiosystématique du genre *Doronicum* et plus particulièrement *Doronicum granandifolium* Lam, Sciences pharmaceutique, 42, Lyon.
- [25] GHANNADI, A., SAJJADI, S. E., KABOUCHE, A., KABOUCHE, Z. (2004). *Thymus fontanesu*, Boiss, Reut. A potential source of thymol-Rich essential oil in North Africa. Z.Naturforsch. 59c, 187-189.
- [26] MABRY, T. J., MAKHAM, K. R., THOMAS, M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids, 269-271, Springer-Verlag, New York. Heidelberg, Berlin.
- [27] NAKOKI, T. (1935). J. Pharm. Soc. Japon. 55, 967
- [28] ADAMS, R. P. (1995). Identification of essential oil components gas Chromatography/ Mass spectroscopy. Allred Publishing. Co. Carol Stream, 69-212.

Chapitre IV

**Etude de l'activité anti-bactérienne de
l'extrait butanolique et des huiles
essentielles des graines et des tiges du
*Pituranthos scoparius***

Introduction :

Le monde bactérien comprend un très grand nombre d'espèces, certaines sont des pathogènes types d'autres sont commensales, elles peuvent causer des maladies humaines dans des conditions favorables. Les bactéries ont été observées pour la première fois au microscope optique par Leeuwenhook en 1675 [1]. Ce n'est que deux siècles plus tard que leur rôle dans les processus de fermentation et dans la transmission des maladies a été découvert et que l'étude de leur morphologie a commencé [2]. Beaucoup d'études, se sont intéressées à l'activité antibactérienne de plantes variées [3]. Plusieurs souches bactériennes ont été ainsi testés cependant les résultats sur l'effet d'inhibition de ces bactéries en présence des extraits des plantes, restent contradictoires. De plus, les concentrations limites telles que la CMI (concentration minimum inhibitrice) sont rarement déterminées.

Aussi, on peut distinguer deux genres de bactéries :

Bactérie à gram positif et à gram négatif. Le tableau 1 montre quelques genres de ces bactéries [4].

Tableaux 1: Exemples de souches bactériennes testées.

Bactérie à gram positif	Bactérie à gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus α-hemolytique</i>	<i>Klebsiella pneumoiniae</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella typhymurium</i>
	<i>Enterobacter</i>

Le but de notre travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne, de l'extrait butanolique et des huiles essentielles des tiges et des graines de la plante médicinale *Pituranthos scoparius* sur quelque souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aruginosa*, *Salmonella typhumurium*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus α-hemolytique*.

IV.1: Introduction sur les bactéries

IV.1.1 : Principaux germes responsables d'infection nosocomiales :

Les infections nosocomiales sont les accidents infectieux contractés par le malade au cours de son hospitalisation [2]. Ces infections peuvent être causées par nombreux germes tels que :

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.....

◆*Escherichia coli* :

Elle a été isolée pour la première fois par ESCHERCH en 1885. Elle est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes [6], cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire [6,7].

◆*Klebsiella pneumoniae* :

Elle appartient au groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (K, E, S) [1, 6-8], ces espèces bactériennes longtemps considérées comme commensales sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques. Les bactéries de ce groupe (K, E, S) sont responsables d'une série d'infections nosocomiales telles que les infections péritonéales, infections génitales et vésiculaires [1]...

◆*Enterobacteriaceae* :

Pour cette famille le groupe *Protecea* ou *Proteus* est caractérisé par la possession d'enzymes particulières permettant la desamination oxydative d'acides aminés en acides cétoniques TDA (Tryptophane désaminase) [1, 7].

◆*Pseudomonas aeruginosa* :

Elle a été isolée en 1882 par GESSARD [6,7]. Elle provient du mot latin *aeruginosus* qui veut dire couvert de rouille appelée aussi le bacille pyocyanique, elle est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas* [1, 6-8]. Elle est responsable d'un grand nombre d'infections : infections pulmonaires, uro-génitales, ORL...

♦ *Les Staphylocoques :*

Ils ont été identifiés dès l'aube de l'ère Pasteurienne par Pasteur [1] en 1880. En 1884 ROSENBAACH a obtenu des cultures pures de ces bactéries, en deux groupes selon la couleur des colonies, blanches ou dorées [6].

Les infections *Staphylococciques* occupent en pathologie infectieuse une place importante par leur nombre et leur gravité [1] aussi, ces infections sont très différentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés [9].

♦ *Streptococcus :*

C'est un mot composé (streptus : Flexible, coccus : Grain). Cette bactérie a été observée pour la première fois par BILROTH et EHRLICH en 1874, son identification a été observée dans des blessures infectées [6].

En 1884 ROSENBAACH décrit avec précision le *Streptococcus pyogène* [1, 6, 8] et ce n'est qu'en 1933 que LANCEFIELD établit la classification moderne des *Streptocoques*, basé sur les propriétés anti génétiques [1, 6, 8]. *Les streptocoques* peuvent causer des infections à localisations variées : infection urinaire, infections génitales, cutanées...

♦ *Les Proteus :*

Ce sont des pathogènes occasionnels [8]. Ils sont responsables de nombreuses infections, en particulier chez les immunodéprimés. La bactérie *proteus mirabilis* peut causer des infections urinaires, ou cutanées observées en milieu Hospitalier. Elle est souvent responsable d'infections de la sphère Oto –Rhino-Laryngologique (ORL). Ces infections peuvent être aussi le point de départ de septicémies ou d'atteintes méningées très sévères par contiguïté.

♦ *Les Salmonelles :*

Ces bactéries sont des *entérobactéries* virulentes à tropisme digestif pathogène pour l'homme et pour l'animal. Elles sont l'une des causes principales de toxi-infections alimentaires.

Les Salmonelles sont capables de survivre et de se multiplier dans le cytoplasme des macrophages. Le diagnostic d'une infection à salmonelles est facile, il repose sur l'isolement du germe à partir de la coproculture, il peut être isolé à partir du sang, des selles et parfois des urines [10]. Les colonies de salmonelles sont lisses de types smooth (s) et mesurent 2 à 3mm après 24h d'incubation à 37°C [11].

IV.1.2 : Sensibilité aux agents anti-microbiens :

Tout d'abord il faut noter qu'il existe deux types d'agents anti-bactériens :

☐ - Les agents physiques :

Ils assurent la destruction des germes en modifiant leur environnement physico-chimique, leur multiplication est arrêtée et leur survie compromise.

☐-Les agents chimiques :

Ce sont des substances dont le contact avec les bactéries entraîne soit l'arrêt de leur multiplication (bactériostase), soit leur destruction (bactéricide) [8].

La découverte des antibiotiques a marqué une étape capitale de lutte contre les maladies infectieuses. Ces molécules ont permis d'épargner un grand nombre de vies. Ainsi, pour chaque souche isolée, la recherche de la résistance doit être effectuée. La résistance aux antibiotiques est un phénomène rencontré chez l'homme et chez l'animal.

Cette résistance constitue une caractéristique propre à l'espèce et délimite le spectre d'activité des antibiotiques. Le tableau 2 représente la sensibilité de certaines souches bactériennes aux antibiotiques : Néanmoins, il faut noter que cette sensibilité doit toujours être vérifiée par un Antibiogramme.

Tableaux 2 : Sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.

Souche bactérienne	Antibiotiques aux quels les souches sont sensibles.
<i>Escherichia coli</i>	Amino-Pénicillines, Céphalosporines, quinolones, aminosides Triméthoprime-sulphaméthoxazole [6,7].
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Céphalosporines [1,6], aminosides, la costine, l'acide nalidixique, l'association thriméthoprime-sulfaméthoxazole [6].
<i>Proteus mirabilis</i>	Les aminopénicillines, céphalosporines, aminosides, quinolones et triméthoprime-sulfaméthoxazole [1, 6].
<i>Salmonella typhimurium</i>	L'ampicilline, céphalosporines, tétracyclines [10].
<i>Streptococcus α-hémolytique</i>	Les pénicillines, les tétracyclines.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aminosides (Gentamicine et tobramycine), Macrolides (érythromycine et spiramycine), Les lincosamines (La lincomycine et la clyndamycine).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbénicilline, ticarcilline, gentamicine, tobramycine, Colistine [1, 8], céphalosporines de la troisième génération (cefsulodine, céftazidime). Quinolones de la deuxième génération (péfloxacine, ciprofloxacine).

IV.2 : Etude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius* :

L'étude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius* a été effectuée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-universitaires, Benbadis de Constantine, sur les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thiphymurium*, *Streptococcus α -hémolytique*

IV.2.1 : Méthodes utilisées

IV.2.1.a : Méthode de diffusion sur milieu gélosé –Antibiogramme– **(Méthode des disques)**

#-Préparation des disques:

On a utilisé le papier Wattman N° 3 coupé en disques de 6 mm. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer.

Les disques, une fois préparés, sont placés dans une boîte de pétri (en verre) contenant 10 ml d'eau distillée et auto clavés pendant 20 mn à 120 C°.

-Milieu:

La Gélose Muller – Hinton est coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4 mm, les géloses sont pré- séchées avant l'emploi.

-Inoculum:

On racle 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 18h sur le milieu d'isolement.

On décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 ‰ puis on homogénéise la suspension bactérienne, son opacité étant de 0.08 à 0.1 pour 625 nm.

-Ensemencement :

Cette opération doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis on fait flotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

L'opération doit se faire 2 fois en tournant la boîte d'un angle de 60° à chaque fois.

Après application immédiate des disques, les boîtes sont laissées pendant 15 mn à température ambiante.

Il faut noter que chacune des boîtes de pétri contient 4 disques et à l'aide d'une micro-pipette on met sur chaque disque une concentration différente puis on incube pendant 18h à 35° C.

-La lecture:

On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition avec un pied à coulisse ou une règle, pour chacune des boîtes de pétri.

Remarque :

Pour les bactéries exigeantes :

- la gélose Muller Hinton est additionnée de 5% de sang de mouton.
- L'inoculum est réalisé à partir d'une culture pure, de 20 à 24 h sur gélose au sang de mouton.
- Pour maintenir en vie les souches bactériennes utilisées, plusieurs repiquages par 24 h ont été réalisés.
- Les milieux utilisés sont des milieux sélectifs qui dépendent du germe testé : Héктоen pour *les entérobactéries* et *P. aeruginosa*, milieu de Chapman pour *S.aureus* et le milieu Muller-Hinton additionné de 5% de sang de mouton pour *les streptocoques*.

Une fois l'antibiogramme réalisé et les diamètres des zones d'inhibition mesurés avec précision, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antibactérienne; il s'agit de la détermination de la CMI.

IV.2.1.B : Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)

-Définition:

On peut définir la CMI par la concentration minimum inhibitrice ou bien la plus petite concentration d'un antibiotique qui peut inhiber le développement des bactéries pendant 18 à 24 h à 37°C. On peut la déterminer, soit en milieu liquide soit en milieu solide.

-Matériel à préparer :

- Gamme de concentrations de l'extrait.
- Série de boîtes de pétri.
- Série de tubes contenant 18 ml de M-H fondu et ramené à 50 C°.
- Bouillon de culture de 18 h de la bactérie à étudier ou une suspension en densité équivalente.

#-Réalisation :

La solution a été préparée en solubilisant 20 mg de l'extrait butanolique de la plante *Pituranthos scoparius* dans une solution de 10 ml d'éthanol et on appelle cette solution, la solution mère.

A partir de la solution mère on réalise une série des dilutions.

TABLEAU 3 : les différentes dilutions de la solution mère.

Concentration initiale en µg/ml	Volume en ml	Volume d'eau distillée en ml	Concentration finale en µg/ml
2000	6.4	3.6	1280
1280	2	2	640
	1	3	320
	0.5	3.5	160
	0.5	7.5	80
80	2	2	40
	1	3	20
	0.5	3.5	10
	0.5	7.5	5
5	2	2	2.5
	1	3	1.25
	0.5	3.5	0.63
	0.5	7.5	0.32

Pour avoir la concentration de 1280 µg /ml à partir de la solution de 2000 µg /ml on prend 6.4 ml de cette dernière à laquelle on ajoute 3.6 ml d'eau distillée.

Cette gamme de concentrations qui a été utilisée pour déterminer la CMI de l'extrait butanolique de la plante *Pituranthos scoparius*, a été réalisée de manière classique.

#-Procédé:

On a préparé une culture en phase stationnaire de la bactérie à étudier

- D'abord on a repiqué 0.1 à 0.3 ml de la culture de 18h dans 10 ml de bouillon M-H ou un autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier.
- On a mis 2 ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- On ajoute 18 ml de la gélose M-H, on mélange bien.
- On laisse les boîtes de pétri quelque mn sur la paillasse pour que la gélose se solidifie.
- Les boîtes sont laissées à sécher 30 mn à l'étuve à 37°C (boîtes ouvertes).
- Enfin on ensemence en stries, à l'anse de platine ou à la pipette rodée, sur toutes les boîtes contenant l'extrait mélangé de la solution M-H. puis on incube ces boîtes pendant 18h à 37°C

#- Lecture :

On lit la concentration minimum inhibitrice (CMI) : Concentration pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible.

IV.2.2 : Résultats et discussion :

IV.2.2.a : Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait butanolique sur les différentes souches bactériennes utilisées)

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait butanolique de la plante *Pituranthos scoparius* sont mesurés après 18 h d'incubation.

Les diamètres d'inhibition figurent dans le tableau 4.

Tableau 4: Zones d'inhibition en mm

Souche bactérienne	Diamètre en mm			
	ATB	ATB/2	ATB/4	ATB/8
<i>Escherichia coli</i>	24	16	14	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	24	22	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	14	14	12
<i>Enterobacter</i>	22	20	18	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	30	26	24	18
<i>Streptococcus</i> α - hémolytique	24	18	12	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	24	10	8
<i>E. coli</i> ATCC25922	22	18	18	16

IV.2.2.b : Détermination de la CMI (Concentration minimum inhibitrice)

Les résultats de la CMI (concentration minimum inhibitrice) de l'extrait butanolique de la plante *Pituranthos scoparius* figurent dans le tableau 5:

Tableau 5: CMI de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius*

Souche bactérienne	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Streptococcus</i> α -hémolytique	64
<i>Enterobacter</i>	128

NB :

- Pour chaque souche testée la CMI est déterminée trois fois pour nous assurer que les résultats sont reproductibles.

-La CMI peut être déterminée soit en milieu solide soit en milieu liquide. Nous avons choisi la première méthode parce qu'elle est plus facile à réaliser.

IV.2.3 : Discussion des résultats :

Nous avons réalisé un antibiogramme et déterminé la CMI de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius vis-à-vis* de plusieurs souches de références et plusieurs germes isolés à partir de prélèvements pathologiques.

Les tests que nous avons effectués montrent que notre extrait a une bonne activité surtout *vis-à-vis* de *Pseudomonas aeruginosa ATCC27853* et *Staphylococcus aureus ATCC 25923* avec une zone d'inhibition de 30 mm pour chaque souche bactérienne et une CMI très faible pour *Pseudomonas aeruginosa ATCC27853* (0,125µg/ml).

L'extrait butanolique a aussi manifesté une bonne activité antibactériennes *vis-a-vis* des souches de *E. coli ATCC* et *E. coli* avec des zone d'inhibition de 24 mm et 22 mm et une CMI très faible par rapport à toutes les souches testées pour *K. coli ATCC* (0,03 µg/ml).

IV.3 : Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* :

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* a été aussi réalisée au laboratoire de bactériologie du CHU Ben badis de Constantine. Nous avons choisi les mêmes souches bactériennes que nous avons déjà utilisées pour l'extrait butanolique :

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus α -hémolytique* et *Salmonella typhimurium*.

L'étude de l'activité anti-bactérienne est faite en 2 parties :

- 1-Antibiogramme par diffusion sur milieu géloses (Méthode de diffusion des disques).
- 2- Détermination de la concentration minimum inhibitrice (CMI).

IV.3.1 : Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé :

(Méthode des disques)

Dans la réalisation de l'antibiogramme pour les deux huiles (graines et tiges) du *Pituranthos scoparius*, nous avons suivi le même protocole que nous avons déjà utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé, pour déterminer les zones d'inhibition de l'extrait butanolique de la même plante.

IV.3.2 : Détermination de la CMI (Concentration minimum inhibitrice) :

La CMI peut être déterminée soit en milieu solide soit en milieu liquide.

Nous avons utilisé la méthode de détermination de la CMI sur milieu solide.

Il faut noter que la concentration initiale de l'huile essentielle des tiges et des graines que nous avons utilisé est de 80 mg alors que celle de l'extrait butanolique était de 20mg

IV.3.3 : Résultats de l'étude de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius* :

-Résultats de l'antibiogramme :

Après 24h d'incubation à l'étuve à 37°C (les *streptocoques* nécessitent une étuve à CO₂), on a récupéré les boîtes et on a mesuré les zones d'inhibition de chaque souche bactérienne testée et pour chaque huile (tiges et graines), on a obtenu les résultats dressés dans le tableau 6 .

Tableau 6 : Zones d'inhibitions des souches bactériennes des huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius*

Souches bactériennes	Zones d'inhibition des souches bactériennes (mm) dans les dilutions d'huiles essentielles des tiges et des graines du <i>Pituranthos scoparius</i>							
	Tiges				Graines			
	ATB	ATB/2	ATB/4	ATB/8	ATB	ATB/2	ATB/4	ATB/8
<i>Enterobacter</i>	22	20	16	14	30	24	20	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28	22	18	16	24	20	18	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	22	20	20	28	24	22	20
<i>Proteus mirabilis</i>	22	18	16	16	30	26	22	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	32	30	26	22	28	26	22	20
<i>Salmonella thiphymurium</i>	30	24	22	18	24	22	20	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	22	18	14	24	22	20	18
<i>Streptococcus α-hemolytique</i>	24	16	16	14	26	22	22	18

-Résultats de la CMI(Concentration minimum inhibitrice) :

Les résultats de la CMI des deux huiles essentielles du *Pituranthos scoparius* des graines et des tiges sont représentés dans le tableau 7 :

Tableau 7 : CMI ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius*.

Souches bactériennes	Concentration minimale inhibitrice en $\mu\text{g/ml}$ des huiles essentielles des tiges et des graines (CMI)	
	Tiges	Graines
<i>Enterobacter</i>	256	40
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	256	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	160
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0.156
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1.25
<i>Salmonella thiphymurium</i>	128	320
<i>Staphylococcus aureus</i>	256	20
<i>Streptococcus α-hemolytique</i>	256	-

IV.3.4 : Discussion des résultats :

L'étude de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles, des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius*, vis-à-vis des différentes souches testées par la méthode de l'antibiogramme et la CMI, montre que l'activité varie en fonction de la souche testée et de l'huile concernée. En comparant les valeurs de la CMI et de l'antibiogramme on remarque que l'huile essentielle des graines présente une activité antibactérienne plus forte que celle des tiges, ceci peut être expliqué par la différence des compositions de ces huiles comme il est indiqué dans le tableau des composants des huiles dans le chapitre III.

L'huile essentielle des graines majoritairement composée de : dill apiol (12.20 %), limonène (11.17%), myristine (11.12%), l' α -pinène (8.16%), β -cymène (7.46%) et de thymol (5.88%), manifeste une bonne activité surtout vis-à-vis de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des zones d'inhibition respectives : 30 mm, 28 mm et 28 mm, alors que l'huile essentielle des tiges majoritairement composée de : germacrène D (12.73%), limonène (9.78%), α -phellandréne (7.11%), α -pinène (6.81%) et de méthyl eugénol (5.87%) a une bonne activité anti-bactérienne vis -à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Salmonella thiphymurium* et *Escherichia coli* ATCC 25922 avec des zones d'inhibition respectives : 32 mm, 30 mm et 28 mm. En superposant les compositions de ces deux huiles on constate que par mis les composants majoritaires, seuls le limonène et l' α -pinène sont trouvés en quantités comparables.

BIBLIOGRAPHIE :

- [1] FERRON, A., (1976). Bactériologie (à l'usage des étudiants en médecine). Ed. Gouan et Roques (8^{ème} édition).

- [2] CARBONELLE, B., DENIS, F., MARMONIER, A., PINON, G., VARGUAS, R. (1987). Bactériologies médicales : techniques usuelles. Ed. SIMEP (2^{ème} tirage).

- [3] TOMAS-BABERAN, F. A., GARCIA-VIGURA, C., FERRERS, F., THOMAS-LORENTE, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*. 1(34), 191-196.

- [4] IKAN, R. (1991). Natural products a laboratory guide. 2nd edition, Academic press. New York.

- [5] KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., AMBROSANO, G.M.B., MAMURATA, R.M., YATSUDA, R., IKEGAKI, M., PARK, Y.K. (2000). Effect of new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans Streptococci. *Curr . Microbiol* 41(3), 192-196.

- [6] AVRI, J.L., DABERNAT, H., DENIS, F., MOTEIL, H. (1992). Bactériologie clinique. Ed. Marketing (1^{ère} édition), Paris.

- [7] BERCHE, P., GAILLARD, JI., SIMONET, .M. (1989). Bactériologie: les bactéries des infections humaines. Ed. Flammarion (1^{ère} édition). Paris.
- [8] LECLERC, H. (1975). Microbiologie générale. Ed. DOIN.
- [9] Le MINOR, L., VERO, M. (1982). Bactériologie Médicale. Ed. Flammarion. (1^{ère} édition). Paris.
- [10] Le MINOR, L. (1984). *Salmonella* en bactériologie médicale, édité par : L., Le Minor et M., Véron. Paris.
- [11] LE MINOR, L., VERON, M., POPOF, M. (1982). Taxonomie des *Salmonella*. *Ann. Microbiol.* 133B, 223-243.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons entrepris une étude phytochimique et biologique de l'un des représentants de la flore du Sahara algérien, le *Pituranthos scoparius* (Ombellifère), très connu en médecine traditionnelle maghrébine. Nos travaux ont concerné l'extrait butanolique et les huiles essentielles des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius*, récolté à Ghardaïa.

Les séparations chromatographiques effectuées sur l'extrait butanolique (colonne, CCM, papier) et l'utilisation des techniques spectroscopiques (UV, RMN..) nous ont permis d'identifier 3 flavonoïdes isolés pour la première fois du genre *Pituranthos* :

- 6, 8-di C-glucosul apigénine.
- 3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine.
- 7-O-glucosul apigénine (apigétrine).

L'étude de l'activité anti-bactérienne de l'extrait butanolique du *Pituranthos scoparius* a montré que notre extrait a une bonne activité surtout *vis-à-vis* de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC.

Les huiles essentielles des graines et des tiges ont manifesté une bonne activité anti-bactérienne *vis-à-vis* les souches testées.

L'huile essentielle des tiges, majoritairement composée de germacrene D (12.73%), limonène (9.78%), α -phellandréne (7.11%), α -pinène (6.81%) et du méthyl eugénol (5.87%), a surtout inhibé la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella thiphimurum* et *Escherichia coli* ATCC 25925, avec des zones d'inhibition respectives de 32 mm, 30 mm et 28 mm. L'huile essentielle des graines majoritairement composée de dill apiol (12.20 %), limonène (11.17%), myristine (11.12%), α -pinène (8.16%), β -cymène (7.46%) et de thymol (5.88%), a montré une meilleure activité anti-bactérienne *vis-à-vis* de *Proteus*

mirabilis, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition respectives de 30 mm, 28 mm et de 28 mm et des CMI respectives de 0.156 µg/ml, 0.125 µg/ml et 160 µg/ml.

Abstract

The genus *Pituranthos* comprises 20 species, three of them grow in Algeria. Coumarins are the principal secondary metabolites characterizing this genus. Flavonoids have been isolated only from the species *P. tortuosis*. Our phytochemical study on the endemic species *P. scoparius*, based on the chromatographic techniques (column, TLC, paper), permitted us to isolate 3 flavonoids, which have been identified by using the classical spectroscopic methods (UV, ¹HNMR, ¹³CNMR).

The study of the anti-bacterial activities of the essential oils of the stems and seeds and the butanolic extract showed a good activity against the tested strains.

The essential oil of the stems inhibited strongly the growth of the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thiphymurium* and *Escherichia coli* ATCC 25922, while the oil of the seeds exhibited the highest anti-bacterial activity against *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The butanolic extract showed a good anti-bacterial activity against : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Key words : *Pituranthos scoparius*, *Apiaceae* , Flavonoids, Anti-bacterial activities, Essential oil

الملخص:

يحتوي الجنس *Pituranthos* على حوالي 20 نوع منها ثلاث أنواع جزائرية حيث تُعتبر الكومارينات من أهم نواتج الابيض الثانوي المميزة لهذا الجنس، كما تم عزل الفلافونيدات كذلك من النوع *P. tortuosus*.

تمكنا من خلال دراستنا الفيتوكيميائية للنوع الأصيل *P. scoparius* من عزل 3 فلافونيدات. تم تحديد البنى الجزئية للمركبات بالإعتماد على الطرق الفيزيوكيميائية (مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV) ، مطيافية الرنين المغناطيسي النووي، ^{13}C RMN 1H)) وقد بينت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للسيقان و بذور النبتة و كذلك للمستخلص البوتانولي فعالية جيدة مضادة للبكتيريا مع السلالات المدروسة، حيث أدى مستخلص الزيت الأساسي لسيقان نبتة إلى تثبيط النمو البكتيري لكل من *Pseudomonas aeruginosa* ، *Salmonella thiphymurum* , *Escherichia coli* ATCC 25922 في حين أبدى مستخلص الزيت الاساسي للدور فعالية جيدة مع كل من *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* اما فيما يخص المستخلص البوتانولي فقد كان تأثيره الاكبر *Pseudomonas aeruginosa*.

على *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli*.

الكلمات المفتاحية:

Pituranthos scoparius، الفلافونيدات، الزيت الأساسي، الفعالية المضادة للبكتيريا.

Résumé

Le genre *Pituranthos* comprend 20 espèces dont trois croissent en Algérie. Les coumarines sont les principaux métabolites secondaires caractérisant ce genre. Des flavonoïdes ont été isolés de la seule espèce *P. tortuosus*.

Notre étude phytochimique de l'espèce endémique *P. scoparius* a permis, grâce aux techniques chromatographiques (colonne, CCM, papier), de séparer 3 flavonoïdes qui ont été identifiés grâce aux méthodes spectroscopiques classiques (UV, RMN ¹H, RMN ¹³C). Ces flavonoïdes sont décrits pour la première fois pour le genre *Pituranthos*.

L'étude de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles des tiges et des graines ainsi que de l'extrait butanolique a montré une bonne activité *vis-à-vis* des souches testées. L'huile essentielle des tiges inhibe fortement les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thymurium* et d'*Escherichia coli* ATCC 25922, alors que celles des graines a montré une meilleure activité anti-bactérienne *vis-à-vis* de, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et de *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait butanolique a révélé une bonne activité anti-bactérienne *vis-à-vis* de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Mots clés : *Pituranthos scoparius*, *Apiaceae*, Flavonoïdes, Activité anti-bactérienne, Huile essentielle