

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



**Université de Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie**



Mémoire

**En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Chimie pharmaceutique**

Thème

**Etude phytochimique d'une plante de la famille des
Astéracées**

Présenté par :
Labreche Soumia
Mecheter Meriem

Le : 03 / 07 / 2017

Devant les membres du jury :

Mlle. M. Kemel

Université de Jijel

Présidente

Mme. Z. Bououden

Université de Jijel

Examinatrice

Mme. M. Benteljoune

Université de Jijel

Encadreur

Année Universitaire : 2016-2017

لا يقبل
Exclus du Prêt.

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



Université de Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Chimie pharmaceutique

Thème

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة والإعلام الآلي
المكتبة
رقم البكرة: 0019F

Etude phytochimique d'une plante de la famille des
Astéracées

Présenté par :
Labreche Soumia
Mecheter Meriem

Le : 03 / 07 / 2017

M. Chi. Phor. 09/17

Devant les membres du jury :

Mlle. M. Kemel

Université de Jijel

Présidente

Mme. Z. Bououden

Université de Jijel

Examinatrice

Mme. M. Benteljoune

Université de Jijel

Encadreur

Année Universitaire : 2016-2017



Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons en second lieu à remercier notre encadreur Mme, **M. Benteldjoune** pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également à Mlle, **M. Kemel**, président du jury pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions.

Nos remerciements s'adressent également à Madame, **Z. Bououden** pour sa présence dans ce jury en tant qu'examineur.

Nous remercions également nos chers parents pour leur patience, leur aide, et leur soutien affectif, ainsi que nos proches, nos amis pour leurs encouragements et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin.

Nous profitons de l'occasion pour remercier tous nos camarades de la promotion de Chimie Pharmaceutique 2016/2017.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mon très chère père AHMED qui m'a
toujours soutenu, et qu'a été toujours présent
pour moi.*

*A la plus chère au monde, ma mère SAIDA qui
m'a accompagnée tout au long de ce parcours et
qui a toujours m'encouragé durant mes études.*

A ma chère sœur RANIA.

A mes frères HOUSSEM et WALID.

A ma famille LABRECHE et MOUSSAOUI.

*A toutes mes amies et toute personne qui
m'aime.*

SOUMIA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mon chère père BOUZID et à la plus chère au monde ma mère SOUAD qui m'ont aidé à être ce que je suis et qui m'ont soutenue et encouragés durant toute la période de mes études et à qui je souhaite une long et heureuse vie.

A mes chers frères IBRAHIM, ISHAK, YAKOUB, ABD ALLAH ET ISMAIL.

A toute ma famille MECHETER.

A toutes mes amies, mes proches et à tous ceux qui m'aime.

MERIEM

Abréviations

C	Carbon
OH	Hydroxyle
UV	UltraViolet
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
CoA	Cyclo-oxygénase
HIV	Virus Immuno déficience Humaine
SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
HV	Herpe Virus
ADV	ADénoVirus
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CP	Chromatographie sur Papier
CHLP	Chromatographie Liquide à Haute Peression
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
°C	Température en degrés Celsius
R_f	Rapport frontale
NaOH	Hydroxyde de sodium
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
NaOAc	Acétate de sodium
H₃BO₃	Acide borique
MeOH	Méthanol
H	Hydrogène
ppm	partie par million
J	Constante de couplage
Hz	Hertz

d	doublet
g	gramme
V	Volume
ml	millilitre
H₂O	Eau
h	heure
R	Rendement
m	masse
CHCl₃	Chloroforme
AcOEt	Acétate d'éthyle
n-BuOH	n-Butanol
FeCl₃	Chlorure ferrique
HCl	Acide chlorhydrique
Mg	Magnésium
H₂SO₄	Acide sulfurique
GF	Gel fluorescence
F	Fraction
nm	nanomètre
SF	Sous Fraction
P	Produit.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	DiMethyl SulfOxyde
SM	Solution Mère
ECH	Extrait Chloroformique
EAC	Extrait d'acétate d'éthyle
EBU	Extrait butanolique
D	Dillution

mm millimètre
s Singulet
 λ Longueur d'onde



Liste des tableaux

Chapitre 1 : Etudes bibliographiques

Tableau 1	Principaux types des coumarines	09
Tableau 2	Systématique de l'espèce <i>Ormenis mixta</i>	10
Tableau 3	Quelques travaux antérieurs effectués sur le genre <i>Ormenis mixta</i> .	11

Chapitre II : Les flavonoïdes

Tableau 1	Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes.	16
Tableau 2	Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.	21
Tableau 3	Les déplacements observés des bandes I et II en UV-Visible après addition des réactifs.	22
Tableau 4	Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes.	24
Tableau 5	Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.	24
Tableau 6	Déplacement chimiques et constante de couplage des protons du noyau B (mono- substitué).	25
Tableau 7	Déplacement chimiques et constante de couplage des protons du noyau B (di- substitué).	25

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Ormenis mixta*

Tableau 1	Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par chromatographie sur colonne.	34
Tableau 2	Regroupement final des fractions de la colonne A.	35
Tableau 3	Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par chromatographie sur colonne.	37

Tableau 4	Les caractéristiques des souches utilisées et les principales maladies qu'ils peuvent causer chez l'homme.	41
Tableau 5	Les différentes dilutions avec les concentrations finales.	43
Chapitre IV : Résultats et discussion		
Tableau 1	Rendement des extraits.	46
Tableau 2	Couleur et aspect de différents extraits d' <i>Ormenis mixta</i> .	46
Tableau 3	Résultats de screening phytochimique d' <i>Ormenis mixta</i> .	47
Tableau 4	Valeurs des rapports frontaux du produit P ₄ dans les deux systèmes S1 et S2.	50
Tableau 5	Données de la série spectrale UV-visible du composé P ₄ .	51
Tableau 6	Données de la spectroscopie de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 250 MHz) du composé P ₄ .	54
Tableau 7	Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle.	55
Tableau 8	Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanolique	56
Tableau 9	Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique.	57

Liste des figures

Chapitre 1 : Etudes bibliographiques

Figure 1	Quelques plantes de la famille des astéracées.	04
Figure 2	Exemples des terpènes.	06
Figure 3	Exemples des alcaloïdes.	07
Figure 4	Acides benzoïque.	07
Figure 5	Acide cinnamique.	07
Figure 6	Structure du 2-phényl chromane.	08
Figure 7	Structure générale des flavonoïdes.	08
Figure 8	Exemple d'un tanin.	08
Figure 9	La plante <i>Ormenis mixta</i> .	10

Chapitre II : Les flavonoïdes

Figure 1	Structure de base des flavonoïdes.	15
Figure 2	Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl-CoA et de la phénylalanine d'après Heller et Forkmann.	18
Figure 3	Plaque chromatographique éluée permettant le calcul du R_f .	20
Figure 4	Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.	23
Figure 5	La forme cinnamoyle.	23
Figure 6	La forme benzoyle.	23

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Ormenis mixta*

Figure 1	La plante pendant la macération.	30
Figure 2	Protocole d'extraction d' <i>Ormenis mixta</i> .	31
Figure 3	Les fractions séparées par CCM à la lumière du jour et sous lampe UV.	35
Figure 4	Séparation de la fraction F ₁₀ par CC.	37

Figure 5	Visualisation des sous-fractions séparées par CCM sous la lampe UV.	38
Figure 6	Visualisation des sous-fractions séparées sous la lampe UV.	38
Figure 7	Les sous-fractions séparées par CCM sous la lampe UV.	39
Figure 8	Protocole de séparations chromatographiques effectuées sur l'extrait d'acétate d'éthyle.	40
Chapitre IV : Résultats et discussion		
Figure 1	Rendement des extraits.	47
Figure 2	Détection chimique des polyphénols.	48
Figure 3	Détection chimique des flavonoïdes.	48
Figure 4	Détection chimique des tanins.	48
Figure 5	Détection chimique des triterpènes.	49
Figure 6	Détection chimique des alcaloïdes.	49
Figure 7	Spectres de la série spectrale UV-visible du composé P ₄ .	52
Figure 8	Structure partielle du produit P ₄ .	53
Figure 9	Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 250 MHz) du produit P ₄ .	54
Figure 10	Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 250 MHz) du produit P ₄ étalement.	54
Figure 11	Structure finale du produit P ₄ : 4', 5, 7-trihydroxy flavone ou apigénine.	55
Figure 12	Effet de l'extrait acétate d'éthyle sur les cinq souches bactériennes.	56

Figure 13	Effet de l'extrait butanolique sur les cinq souches bactériennes.	56
Figure 14	Effet de l'extrait chloroformique sur les cinq souches bactériennes.	57

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
Références bibliographiques.....	03
Chapitre I : Etudes bibliographiques	
I. Introduction.....	04
II. Description de la plante étudiée.....	04
II.1. La famille des astéracées.....	04
II.1.1. Aspect botanique.....	05
II.1.2. Aspect chimique.....	05
II.1.2.1. Les métabolites secondaires chez les astéracées.....	05
II.1.2.1.1. Les terpènes.....	05
II.1.2.1.2. Les alcaloïdes.....	06
II.1.2.1.3. Les polyphénols.....	07
II.1.2.1.3.1. Les acides phénoliques.....	07
II.1.2.1.3.2. Les flavonoïdes.....	08
II.1.2.1.3.3. Les tanins.....	08
II.1.2.1.3.4. Les coumarines.....	09
II.2. Le genre <i>Ormenis mixta</i>	09
II.2.1. Description et distribution.....	09
II.2.2. Propriétés thérapeutiques et utilisation.....	10
II.2.3. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Ormenis mixta</i>	11
Références bibliographiques.....	12
Chapitre II : les flavonoïdes	
I. Introduction.....	15
II. Définition.....	15
III. Structure.....	15
IV. Classification et distribution.....	16
V. Biosynthèse des flavonoïdes.....	17
VI. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes.....	18
VII. Extraction, isolement, purification et analyse structurale des flavonoïdes.....	19
VII.1. Méthode de séparation et de purification.....	19

VII.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC).....	19
VII.1.2. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	19
VII.2. Méthodes d'analyse et d'identification structurale des flavonoïdes.....	20
VII.2.1. Effet du rapport frontal (R_f).....	20
VII.2.2. La fluorescence sous lumière de Wood.....	20
VII.2.3. La spectroscopie UV-visible.....	21
VII.2.4. La Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	24
a) Protons aromatiques.....	24
b) Protons aliphatiques.....	25
VII.2.5. L'hydrolyse acide des hétérosides.....	26
Références bibliographiques.....	27

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Ormenis mixta*

I. Les étapes d'une étude phytochimique.....	29
I.1. Récolte du matériel végétal.....	29
I.2. Extraction.....	29
I.2.1. Principe et la méthode d'extraction.....	29
I.2.2. Détermination de rendement.....	32
I.3. Screening phytochimique.....	32
I.3.1. Les polyphénols.....	32
I.3.2. Les flavonoïdes.....	32
I.3.3. Les tanins.....	32
I.3.4. Les triterpènes.....	32
I.3.5. Les alcaloïdes.....	33
I.4. Séparation et purification.....	33
I.4.1. Première étape de fractionnement.....	33
I.4.1.1. Préparation de la colonne A.....	33
I.4.1.2. Traitement des Fractions obtenues.....	36
I.4.2. Deuxième étape de fractionnement.....	36
I.4.2.1. Etude de la fraction F_{10}	36
I.4.2.2. Préparation de la colonne B.....	36
I.4.2.3. Traitement des sous-fractions obtenues.....	38
I.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante.....	40

I.5.1. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	41
I.5.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	41
I.5.3. Les milieux de culture.....	42
I.5.4. Méthode de diffusion en milieu solide.....	42
I.5.5. Préparation des dilutions d'extraits d' <i>Ormenis mixta</i>	42
I.5.6. Préparation de l'inoculum.....	43
I.5.7. Ensemencement.....	43
I.5.8. Lecture et analyse.....	43
Références bibliographiques.....	45

Chapitre IV : Résultats et discussion

Etude phytochimique.....	46
I. Extraction.....	46
II. Screening phétochimique.....	47
II.1. Les polyphénols.....	48
II.2. Les flavonoïdes.....	48
II.3. Les tanins.....	48
II.4. Les triterpènes.....	49
II.5. Alcaloïdes.....	49
III. Identification structurale des produits isolés de l'espèce <i>Ormenis mixta</i>	50
III.1. Elucidation structurale de produit P ₄	50
III.1.1. Comportement chromatographique.....	50
III.1.2. Données spectroscopiques.....	51
III.1.2.1. Spectre UV-visible.....	51
III.1.2.2. Spectre RMN ¹ H.....	53
Evaluation de l'activité antibactérienne.....	55
Références bibliographiques.....	60
Conclusion générale.....	61

Introduction générale

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique ou mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) [1].

La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point des médicaments à base de plantes. Aujourd'hui, il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes [2].

L'Algérie est dotée d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Ormenis mixta*, appartenant de la famille des astéracées.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en cinq chapitres :

Le premier chapitre, est consacré à une recherche bibliographique sur les familles des astéracées et les principaux métabolites secondaires suivis par une description botanique, systématique et l'utilisation de l'espèce *Ormenis mixta*.

Le deuxième, est comporte l'étude bibliographique des flavonoïdes, les différentes classes et leurs intérêts thérapeutiques, y compris les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de produits naturels.

Le troisième, il est consacré à la présentation de nos travaux personnels comportant la description des travaux phytochimiques sur la séparation et l'identification des produits séparés.

Introduction générale

Le quatrième chapitre, concerne l'évaluation de l'activité antibactérienne de notre plante, contre quelques souches bactériennes

Le cinquième chapitre présente les résultats obtenus accompagnés de leur discussion.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Adjanohoum, J.E., Aké.Assi, L., Floret, J.J., Guinko, S., Koumaré, M., Ahyi, M.R., et Raynal, J., (1979). Médecine traditionnelle et Pharmacopée Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, ACCT, Paris., 291.
- [2] Potterat, O., (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Org. Chem.* 1 : 415-440.

Chapitre I

Etudes bibliographiques

I. Introduction

Les plantes médicinales s'agissent d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Ils sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [1].

Une des originalités majeures de plante médicinales réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à coté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [2].

La phytochimie, où la chimie des végétaux, est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes.

II. Description de la plante étudiée

II.1. La famille des astéracées

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme d'inflorescence particulière des astéracées. Les Astéracées anciennement appelées composées sont une grande famille de plantes à fleurs (angiospermes), classe des dicotylédones sous classes des gamopétales, comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces décrites. Elles sont particulièrement nombreuses dans les régions tropicales et subtropicales notamment l'Amérique centrale, la méditerranée, l'Afrique du sud et l'Asie centrale [3].

Les astéracées sont utilisées dans plusieurs domaines : en alimentation tel que la laitue, l'artichaut et le tournesol ; ornementales comme la marguerite et le dahlia ; insecticides comme les espèces du genre *Pyrethrum* et aussi plantes médicinales comme la camomille de genre (*matricaria chamomilla* L et *Anthemis nobilis* L) et le pied de chat (*Antenaria dioca gartn*) [4].



Figure 1 : Quelques plantes de la famille des astéracées.

II.1.1. Aspect botanique

La famille des astéracées présente des caractères morphologiques divers : herbacées à feuilles isolées [5] annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues [6]. L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les astéracées sur ce critère.

II.1.2. Aspect chimique

II.1.2.1. Les métabolites secondaires chez les astéracées

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (glucides, lipides et protéines). Les métabolites secondaires, issus de métabolites primaires, interviennent dans la structure des plantes mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement.

Toute fois, en raison de leur gamme variée de puissance bioactive dans la dépendance de leur structure chimique, ils peuvent fournir des avantages, par exemple la défense contre les agents pathogènes toxiques (virus, bactéries, champignons) ou herbivores ou des prédateurs [5].

Les métabolites secondaires peuvent être accumulés dans toutes les parties de la plante ou seulement dans des organes spécifiques comme les graines ou les racines [5].

En 1987 Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) [7].

II.1.2.1.1. Les terpènes

Les terpènes sont des composés hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ dont le X est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et « n » peut prendre des valeurs (de 1 à 8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base des terpènes est l'isoprène de formule C_5H_8 [8], synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux [8]. L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation [9, 10, 11, 12].

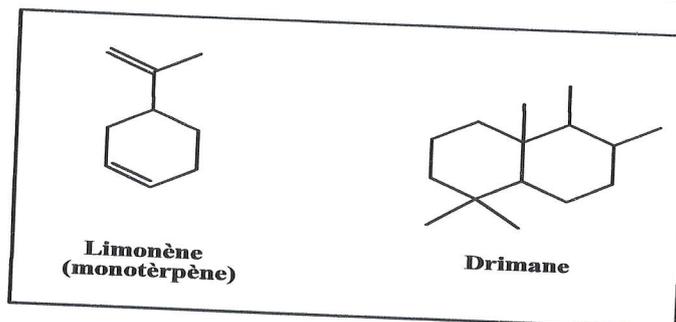


Figure 2 : Exemples des terpènes.

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone...) [8, 12].

Dans le règne végétal, les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires, leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène [10, 13, 14]. A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus grandes familles de composés naturels : hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tétraterpènes (C_{40}) et polyterpènes.

Les terpènes sont connus pour leur activité biologique (antinéoplastique, anthelminitique et antiviral), mais ils montrent une certaine toxicité envers les humains et certains mammifères. Malgré le fait que l'action des terpènes dans les systèmes biologiques est bien connue.

II.1.2.1.2. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W. Meisner en 1818 et est utilisé pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, ce sont des substances organiques azotées d'origine végétal, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique [10]. Généralement les alcaloïdes ont des propriétés très basiques, la plupart, ainsi comme leur nom l'indique ont une réaction alcaline.

Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles [15].

Les alcaloïdes sont caractérisés par une solubilité faible dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool et peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff...). On peut les subdiviser en trois classes [5] sont : les alcaloïdes vrais, les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes.



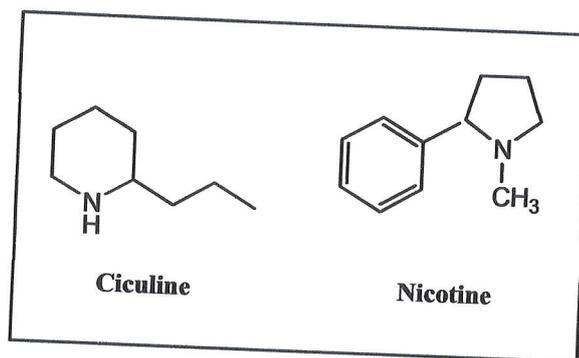


Figure 3 : Exemples des alcaloïdes.

II.1.2.1.3. Les polyphénols

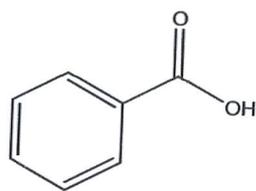
L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules [16] divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [17]. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes [18].

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant.

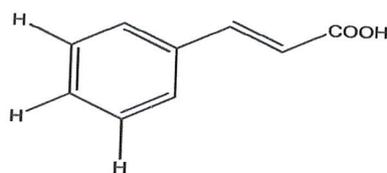
Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en :

II.1.2.1.3.1. Les acides phénoliques

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique [19].



Acide benzoïque



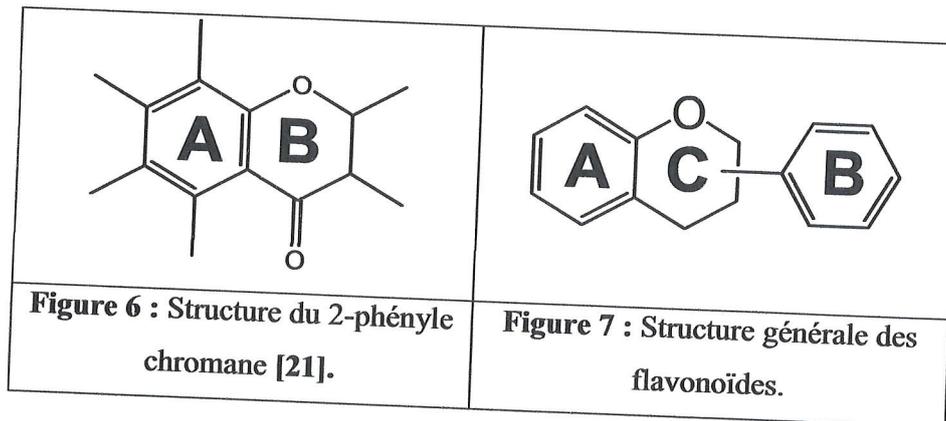
Acide cinnamique

Figure 4 : Acide benzoïque [19].

Figure 5: Acide cinnamique [20].

II.1.2.1.3.2. Les flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane, ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane [21] (Figures 6 et 7). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus [22].



II.1.2.1.3.3. Les tanins

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther et ayant la propriété commune de tanner la peau. Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux à l'état de complexes, les tannoïdes, certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides, tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe qui varie par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation [23].

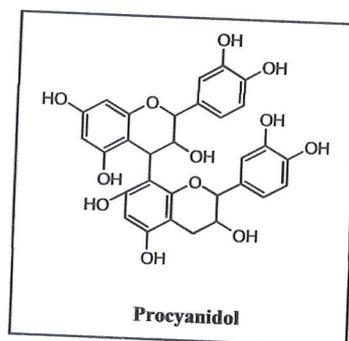


Figure 8 : Exemple d'un tanin.

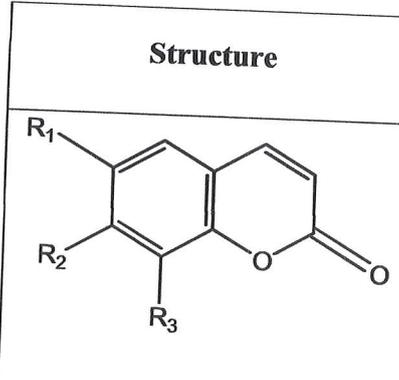
Ils sont divisés en deux groupes d'origine biosynthétiques différentes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [20].

II.1.2.1.3.4. Les coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Elles ont un squelette en C₆-C₃, mais ils possèdent un atome d'oxygène hétérocycle dans le cadre de l'unité C₃ [24]. Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide p-coumarique.

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie et dans les produits cosmétiques [25].

Tableau 1 : Principaux types des coumarines [26].

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbeliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétole
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

II.2. Le genre *Ormenis mixta*

II.2.1. Description et distribution

Ormenis mixta ou *Cladanthus mixtus* porte plusieurs noms communs dont les plus courants sont : « camomille sauvage », « camomille marocaine » et « orménie », probablement originaire d'Afrique du Nord-Ouest. Elle s'est propagée dans tout le bassin méditerranéen à l'état sauvage [27].

C'est une astéracée chaméphyte bisannuelle à nombreuses tiges dressées. La camomille sauvage est une plante herbacée vivace aux feuilles velues. Ses fleurs possèdent un cœur jaune soleil entouré de ligules blanches, elles ressemblent à de petites marguerites. Les fleurs sont récoltées pendant la floraison en mai et juin pour produire l'huile essentielle [27].

Elle est caractérisée par une odeur fraîche balsamique. La plante donne une huile essentielle d'odeur camphrée recherchée en cosmétique, parfumerie et médecine [27].

Cette camomille est souvent confondue avec la camomille romaine (*Anthemis nobilis*), mais aussi avec la camomille allemande (*Matricaria recutita*).



Figure 9 : La plante *Ormenis mixta*.

II.2.2. Propriétés thérapeutiques et utilisation

La camomille sauvage est utilisée en infusion ou sous forme d'huile essentielle pour ses propriétés anti inflammatoire, antiallergique, antispasmodique, relaxant, favorise l'expulsion des gaz et anti névralgique. Elle est ainsi conseillée comme anxiolytique et rééquilibrant du système nerveux central et pour les insuffisances hépatiques et gastriques légères et les colites colibacillaires.

En médecine traditionnelle, la tisane d'*Ormenis mixta* est très prisée en cas d'insomnie, de palpitations et de nervosité. La décoction de la plante est recommandée en cas de fièvre et de douleurs des règles. Elle est parfois employée en compresses sur le front pour soulager les maux de tête et migraines.

En médecine moderne, l'*Ormenis mixta* est surtout employée pour ses propriétés digestives et eupeptiques. En parapharmacie, la plante entre dans la composition de plusieurs shampoings. Cette plante est également utilisée, en compresses oculaires, pour soigner les irritations oculaires et conjonctivites.

Tableau 2 : Systématique d'espèce *Ormenis mixta*.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheophyta</i>
Division	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotyledones</i>
Sous-classe	<i>Astéridées</i>
Ordre	<i>Astérales</i>
Famille	<i>Astéracées</i>
Tribu	<i>Anthémidées</i>
Genre	<i>Ormenis</i>
Espèce	<i>Mixta</i>

II.2.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *Ormenis mixta*

Le tableau 3 résume les travaux antérieurs effectués sur le genre *Ormenis mixta*, contenant les métabolites secondaires déjà isolés et les activités biologiques.

Tableau 3 : Quelques travaux antérieurs effectués sur le genre *Ormenis mixta*.

	Les métabolites secondaires séparés	Les activités biologiques	Références
Espèce <i>Ormenis mixta</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alcoolsmonoterpéniques : Santolina, yomogi et artemisia. • Sesquiterpènes : germacrène D, (<i>E</i>)-β-farnesene et epi-α-cadinol. • Cétone linéaire insaturée : (<i>Z</i>)-heptadeca-9,16-dien-7-one. • Deux coumarines : la corfine et la 3'-hydroxycorfine. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-bactérienne. • Anti-fongique. • Anti oxydante. 	<p>[28]</p> <p>[29]</p> <p>[30]</p>

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., et Guo, Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé., 64(2) : 159-164.
- [2] Jeun, J.M., Annie, F., CHRYSTIAN, J.L., (2005). Les composés phénoliques des végétaux., 203- 204.
- [3] Panero, J.L., Funk, V.A., (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. Molecular Phylogenetics and Evolution., 47: 757-782.
- [4] Guignar, J.L., (1994). Abrégé Botanique, 9ème ed.204.
- [5] Crete, P., (1965). Précis de botanique. Masson, Paris, ed 2., 429.
- [6] Bonnier, (1934). Flore complète de France, Suisse et Belgique. ed 10., 118.
- [7] Peeking, et al., (1987).
- [8] Benaissa, O., (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine., 63.
- [9] Harborne, J.B., (1998). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis, ed 3. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB)., 203-214.
- [10] Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Ed 3 Tec & Doc. Paris., 101-120.
- [11] Klass, C., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R., Bomme, U., Pahl, H., Merfort, I., (2002). Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers, Planta Med., 68 :385-391.
- [12] Malecky, M., (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech., 9 :13-19 : 20 : 27.
- [13] Dey, P.M., Harborne, J.B., (1991). Methods in plant biochemistry. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
- [14] Manitto, P., (1981). Biosynthesis of natural products. John willey et sons. New york.
- [15] Krief, S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle., 32.
- [16] Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M., (1998). Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle, ed INRA, Paris., 145-149.
- [17] Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie., 1: 3-6.

Références bibliographiques

- [18] Harbone, J.B., (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, ed 4. Academic Press, London., 323.
- [19] Belyagoubi, N., Benhammou, N., (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en biologie, université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen., 12.
- [20] Sarni Manchado, P., Cheynier, V., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, ed Lavoisier., 2-10.
- [21] Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, 59: 113-122.
- [22] Edenharder, R., Grünhage, D., (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 540 : 1–18.
- [23] Hemingway, R.W., (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*. Laks P.E, New York
- [24] Vermerris, W., Nicholson, R., (2006). *Phenolic compound biochemistry*, Springer, The Netherlands.
- [25] Kansole, M.M.R., Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkinafaso : cas de *Leucas Martinicensis* (Jacquin), *Brown, R., hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Diplôme d'études approfondies, université de Ouagadougou.
- [26] Macheix, J., Fleuriot, A., Jay-Allemand, C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, ed presses polytechnologiques et universitaires romandes., 4-5.
- [27] Haddad, P.S., Depot, M., Settaf, A., Chabli, A., Cherrah, Y., (2003). Comparative study on the medicinal plants most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada. *J. Herbs, Spices Med. Plants.*, 10(3) : 25-45.
- [28] Zriral, S., Menut, C., Bessiere, J.M., Benjilali, B., (2007). Chemical composition of the essential oils of Moroccan *Ormenis mixta*, Dumort, L., ssp, *Multicaulis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.*, 10 (5): 378 – 385.
- [29] Florent, D., Mourad, B., Jean, C., and Alain, M., (2012). Chemical compositions of the essential oils of the aerial Parts of *Chamaemelum mixtum*, Alloni, L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 60 (6): 1494–1502.

Chapitre II

Les flavonoïdes



I. Introduction

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines [1], il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [1].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [2,3].

Il y a quelques années, les flavonoïdes étaient considérés comme des substances nocives puisqu'ils se sont révélés mutagènes pour les bactéries et génotoxiques pour les cultures de foie de rat [4], mais aujourd'hui on a découvert qu'ils présentent un grand intérêt pour beaucoup de domaines : industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique,....etc [5].

II. Définition

Les « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénoles proviendrait du terme « flavedo », désignant la couche externe des écorces d'orange [6], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde est dû à leur couleur jaune (flavus=jaune en latin) qu'ils engendrent [7,2]. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration, au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes [8]. On les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes [9]. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal [10].

III. Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques en C₆ (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) [11].

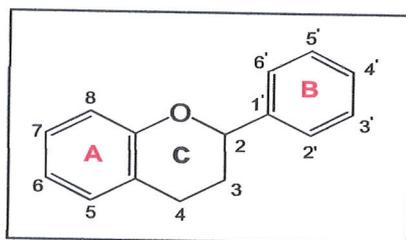


Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes.

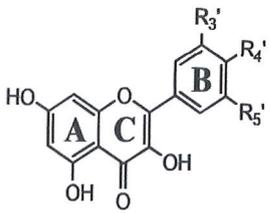
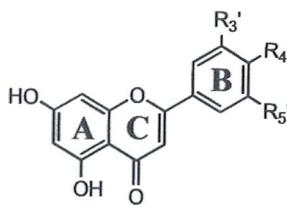
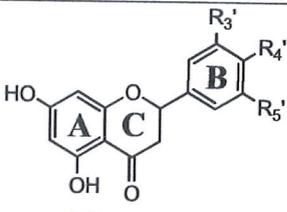
IV. Classification et distribution

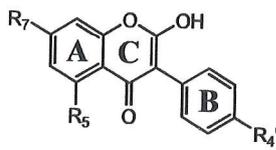
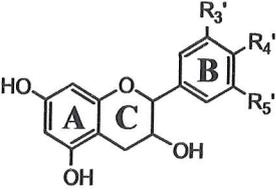
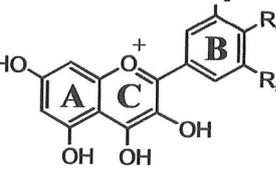
La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'insaturation, de degré d'oxydation (par condensation avec un OH phénolique du noyau (A)), de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle (C), c'est-à-dire, la présence de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo [11], alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles (A) et (B). Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, nous citerons les principales (tableau1): flavonols, flavones, flavanones, flavones, flavan3-ols, anthocyanidines [12].

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens [13], ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (trèfle) [14].

Le tableau 1 représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments [15] :

Tableau 1: Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes.

Flavonoïdes	Exemple	Aliments	Caractéristiques
 <p>Flavonols</p>	<p>Quercétine Kaempférol</p>	<p>Oignon. Poireau. Pommes. Vin rouge. Thé.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.</p>
 <p>Flavones</p>	<p>Lutéoline Apigénine</p>	<p>Persil Céleri.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se différencient des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C₃, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV,</p>
 <p>Flavanones</p>	<p>Naringénine Eriodictyol</p>	<p>Fruits de genre Citrus.</p>	<p>Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃, le naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de Citrus.</p>

 <p>Isoflavones</p>	<p>Genisteine Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C₃. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p>
 <p>Flavan3-ols</p>	<p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine</p>	<p>Vin rouge Thé noire et vert Cacao Chocolat.</p>	<p>Flavan3-ols ainsi que flavan3, 4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques chimiques.</p>
 <p>Anthocyanidines</p>	<p>Cyanidine Delphénidine</p>	<p>Raisins Vin rouge Certaines variétés de Céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>

V. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle (A) est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles (B) et (C) proviennent aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en p-coumarate puis en p-coumaroyl-CoA (figure 2). Le p-coumaroyl-CoA et les trois malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle (C) se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [16].

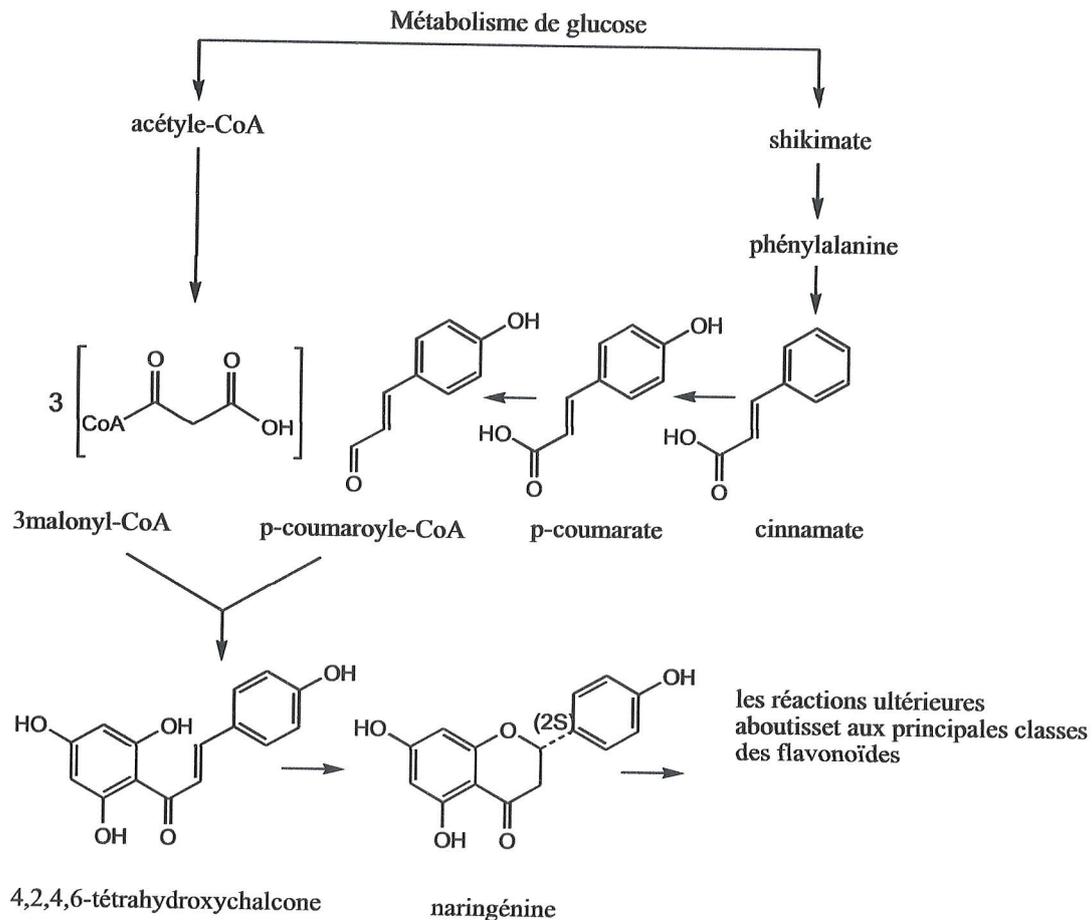


Figure 2 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl-CoA et de la phénylalanine d'après Heller et Forkmann [16].

VI. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, inhibitrice, antibactérienne, toxique,... Les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques...etc [17].

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse ; leurs actions se situent au niveau des petites veines ou capillaires (action de la vitamine p). Ce sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires [5].

Certains flavonoïdes possèdent des activités particulières : diurétique, antispasmodique, anti-ulcère gastrique, anti-inflammatoire [18].

VII. Extraction, isolement, purification et analyse structurale des flavonoïdes**VII.1. Méthode de séparation et de purification**

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Il existe plusieurs méthodes de séparation chromatographique en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode. On peut envisager une chromatographie sur colonne (CC), sur couche mince (CCM) ou sur papier (CP).

Enfin, on peut considérer également la chromatographie liquide à haute pression (CLHP) et la (CPG), qui se présentent comme étant des techniques instrumentales basées sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique.

VII.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC)

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [19]. L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

VII.1.2. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange, d'autre définition la CCM est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules de l'extrait au cours de son fractionnement sur colonne et pour évaluer la complexité des fractions.

Elle repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé [20].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm).

Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le R_f (Rapport frontal : Rapport de la distance de migration du composé par rapport à celle du solvant).

VII.2. Méthodes d'analyse et d'identification structurale des flavonoïdes

VII.2.1. Effet du rapport frontal (R_f)

Le rapport frontal (R_f) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tache du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part [21].

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} = \frac{b}{a}$$

- Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support (phase stationnaire) donné.
- Le R_f est à peu près le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le R_f ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange.

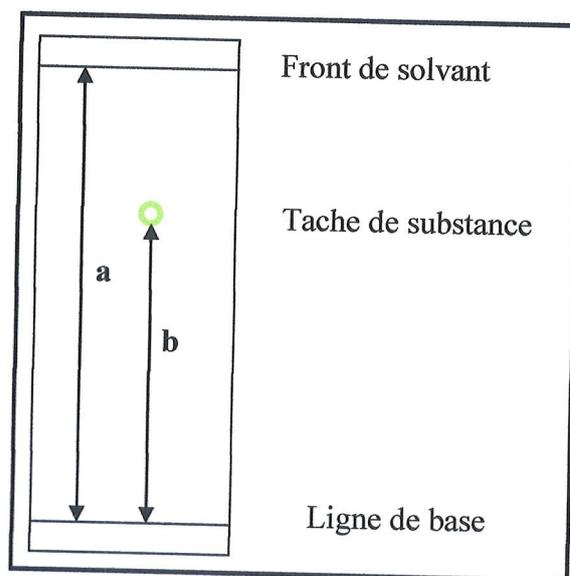


Figure 3 : Plaque chromatographique éluée permettant le calcul du R_f .

VII.2.2. La fluorescence sous lumière de Wood

La fluorescence sous lumière de Wood (la longueur d'onde de 365 nm) est largement utilisée dans l'analyse structurale et l'identification des flavonoïdes. Tous les flavonoïdes apparaissent sous UV sous forme de spots colorés, permettant d'avoir des renseignements pour déterminer leur structure. Le tableau 2 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [22].

Tableau 2 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5, 7,8 trihydroxy. Flavonol avec 3-OR. Chalcones .
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH.
Orange fluorescente	Isoflavones.
Jaune-verte	Aurones.
Bleu-verte	Flavanone sans 5-OH.

VII.2.3. La spectroscopie UV-visible

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des flavonoïdes. Le principe de cette technique est basé sur le fait que chaque composé flavonique à un spectre d'absorption caractéristique dans le milieu méthanoïque, qui change après l'addition de différents réactifs (NaOH, AlCl_3/HCl , $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$) [23].

Les étapes d'enregistrement des spectres en présence de réactifs sont effectuées selon les étapes suivantes :

- **Première étape :** On enregistre le spectre d'absorption dans le méthanol neutre puis immédiatement après l'ajout d'une goutte de NaOH (0,5 N), ensuite on enregistre après 5 minutes.

- **Deuxième étape :** On enregistre une première fois le spectre d'absorption dans le méthanol, puis à cette solution on additionne AlCl_3 (1%) et on enregistre le spectre d'absorption. Après cette opération on rajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (6N) puis on enregistre le spectre de cette nouvelle solution.

- **Troisième étape :** On enregistre dans la solution méthanolique puis on ajoute NaOAc (sec) et on enregistre le spectre, après cette opération on rajoute à cette solution quelques gouttes de solution saturée d'acide borique puis on enregistre le spectre d'absorption.

Tableau 3 : Les déplacements observés des bandes I et II en UV-Visible après addition des réactifs.

Réactifs	Déplacement en nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350	250-280	Flavone
	352-385	250-280	Flavonol (3-OH)
	328-357	250-280	Flavonol (3-OR)
NaOH	+44 à + 65		OH en 4'
	1. stabilité d'intensité/MeOH 2. diminution d'intensité		OR en 4' et OH en 3
	L'intensité diminue avec le temps (décomposition).		3',4' OH ou <i>ortho</i> di - OH sur A (6, 7 ou 7, 8)
	Nouvelle bande/MeOH entre 320 à 335		OH en 7
NaOAc		+5 à+20 Déplacement diminue-en présence d'un substituant en 6 ou 8	OH en 7
		Pas de déplacement ou très faible.	OR en 7
NaOAc/ H ₃ BO ₃	+12 à +36		3', 4' <i>ortho</i> di-OH sur B.
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430		3', 4' <i>ortho</i> 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-OMe
	+50 à +60		3-OH avec ou sans OH en 5
AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)	+20 à +40 avec sommet où épaulement entre (350 - 360)		3', 4' <i>ortho</i> di-OH sur B
	+ 20 à + 25		<i>Ortho</i> di OH sur A et <i>Ortho</i> di OH sur B ou tri OH sur B.

(+) déplacement bathochrome ; (-) hypsochromique.

Les flavonoïdes présentent deux formes limites : la forme cinnamoyle à qui on attribue la bande (I) qui a un pic d'absorption dans le méthanol de (300-400 nm) et la forme benzoyle à qui on attribue la bande (II) qui absorbe dans le milieu méthanoïque à (240-280 nm) [24] (figure 4).

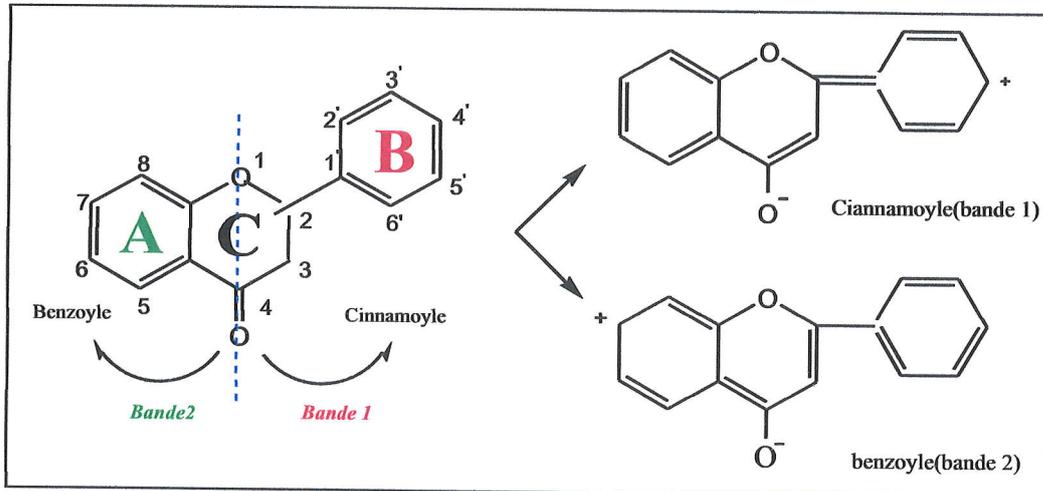


Figure 4 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

La bande I : Située entre 300-400nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau B conjugué avec le groupe carbonyle et la double liaison (C₂-C₃) donnant la forme cinnamoyle elle donne, alors des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

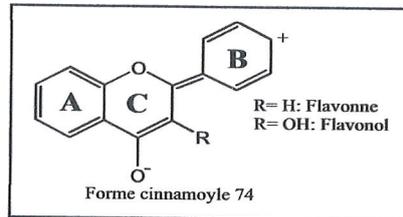


Figure 5 : La forme cinnamoyle.

La bande II : Située entre 240-280 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau A conjugué avec le groupe carbonyle donnant la forme benzoyle.

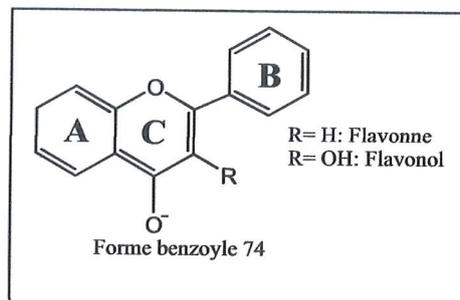


Figure 6 : La forme benzoyle.

La nature des flavonoïdes peut être déterminée selon les valeurs de la bande I et la bande II le tableau 4 montre la relation entre le squelette flavonique et la position des bandes I et II.

• Protons du noyau B

Les protons de ce noyau apparaissent dans l'intervalle {6.7-8.1 ppm}, le déplacement chimique est basé sur les substituant sur le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C, (tableaux 6 et 7) [25].

Tableau 6 : Déplacement chimiques et constante de couplage des protons du noyau B (mono- substitué).

Flavonoïdes	Déplacement chimique (ppm) H ₂ ' , H ₆ ' (J ≈ 8.5Hz)	Déplacement chimique (ppm) H ₃ ' , H ₅ ' (J ≈ 8.5Hz)
4'-hydroxyflavone	7.70 - 7.90 (d)	6.50 - 7.10 (d)
4'-hydroxyflavonol	7.90 - 8.10 (d)	6.50 - 7.10 (d)

Tableau 7 : Déplacement chimiques et constante de couplage des protons du noyau B (di- substitué).

Flavonoïdes	H ₂ '		H ₅ '		H ₆ '	
	δ (ppm)	J(Hz)	δ (ppm)	J(Hz)	δ (ppm)	J(Hz)
Flavone (3',4'-OH ; 3'OMe, 4'-OH)	7.6 – 7.8 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.4 – 7.6 (dd)	2.5, 8.5
Flavone (3',4'-OH ; 3'OH, 4'-OMe)	7.2 – 7.3 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.3 – 7.5 (dd)	2.5, 8.5
Flavonol (3',4'-OH ; 3'-OH, 4'-OMe)	7.5 – 7.7 (d)	2.5	6.7 – 7.1 (d)	8.5	7.6 – 7.9 (dd)	2.5, 8.5

• Protons du noyau C

Le proton H₃ dans la flavone, résonne sous forme d'un singulet dans l'intervalle [6.20 - 6.40] ppm [26].

b) Protons aliphatiques

• Protons du methoxyle

Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.4 et 3.9ppm [25].

• Protons osidiques

Les déplacements chimiques des protons anomérique dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone. La constante de couplage entre le proton anomérique H-1'' du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone, s'il s'agit d'une position α ou β. Pour le sucre glucose, le proton anomérique donne en général un doublet et sa constante de

couplage est de l'ordre 7Hz, car il est toujours en position β d'après la biogénèse. Pour le rhamnose, son proton anomérique donne un doublet aussi mais sa constante de couplage est de $J \approx 2.5$ Hz (position α). On peut aussi reconnaître le sucre rhamnose par le signal du groupement méthyle sous forme de doublet entre 0.8-1.2 ppm et avec une constante de couplage de $J \approx 6$ Hz.

VII.2.5. L'hydrolyse acide des hétérosides

Les flavonoïdes existent sous deux formes : aglycones et glycosides, ces derniers sont des aglycones ou un sucre (ou plusieurs) est lié soit par une liaison C-C ou C-O à l'aglycone, et pour connaître la nature du sucre avec les O-glycosides, on a recours à l'hydrolyse acide qui permet la rupture de la liaison entre l'aglycone et le sucre et ainsi extraire le sucre et l'identifier par CCM, en présence de plusieurs sucres témoins. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés [25].

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Nijveldt, R.J., Van.Nood, E., Van.Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van.Norren, K., et Van.Leeuwen, P.A.M., (2001). Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, 74 : 418-425.
- [2] Malešev, D., Kuntić, V., (2007). Investigation of metal flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal flavonoid complexing reactions. *J. Serbian chem.*
- [3] Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, 3 (4) : 162-169.
- [4] Nugon.Baudon., (1994). Toxic-Enquête sur les aliments d'aujourd'hui. Marabout, ed Jean latté., 76 : 277.
- [5] Diallo, Mamadou.Aliou., (2003). Contribution à l'étude de la composition en polyphenols de *tephrosia pedicellata*, mémoire de DEA de chimie et biochimie des produits naturels.
- [6] Piquemal, G., (2010). Les flavonoides dans « *phyto- aromathérapie* ».
- [7] Duval, C., Duval, R., (1978). Dictionnaire de la Chimie et de ses Applications, ed Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- [8] Wilson, A., (1987). Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *Chem, J., Ecol.*, 13 (3) : 473-493. Guignard, J., (1996). *Biochimievégétale*, Lavoisier, Paris., 175-192.
- [9] Ritch, H., Griesbach, H., Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*.
- [10] *Phytochem.*, (1975), 14 : 2437-42. Erdman, W.J., Balentine, J.D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly.Hollman, J.P., Keen, L.C., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., et Burrowes, J., (2007). Flavonoids and heart health : proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop may 31-june 1, (2005). Washington, *in J. Nutr.*, 137 (3) : 718-73.
- [11] Yao, K., Zhang, L., Zhang, Y., Ye, P., et Zhu, N., (2008). The flavonoid, fistin, inhibits UV radiation- induced oxidative stress and activation of NF-kappab and MAPK signaling in human les epithelial cells. *Mol. Vis.*, 14 : 1865-71.
- [12] Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., De Vos, C. H.R., et Colliver, S., (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of *the flavonoid biosynthesis pathway.*, 53 (377) : 209 -210.
- [13] Urquiaga, I., Leighton, F., (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64.
- [14] Erdman, W.J., Balentine, J.D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly. Hollman, J.P., L-Keen, C., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., et Burrowes, J., (2007). Flavonoids and heart health : proceeding of the ILSI North America

Références bibliographiques

- flavonoids workshop, may 31-june 1, (2005). Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718-737.
- [15] Havsteen, B., (1983). Flavonoids : a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.*, 32 : 1141–1148.
- [16] Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., et Trinajstić, N., (2003). Structure-Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chem acta.*, 76 (1) : 55-61.
- [17] Roulier, G., (2002). La méthodes naturelle antiage (www.naturemania.com).
- [18] Lee et al, (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and higer antioxidant capacity teas and red wine. *J Agric Food chem.*, 51 : 7292-7295.
- [19] Loiseleur, J., (1973). Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique, Tome 1, ed Masson et Cie.
- [20] Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas, M.B., (1970). The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag New York, Heidelberg.*, 254.
- [21] Bronner, W.E., Beecher, G.R., (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A.*, 705 : 247-256.
- [22] Ait Moussa, S., (2003). Etude de la composante flavonique de la plante *Haplophyllum tuberculatum*. Thèse de magister, Université de Constantine.
- [23] Markham, K.R., Mabry, T.J., (1968). A procedure for the ultraviolet spectral detection of ortho dihydroxyl groups in flavonoïds, *Phytochemistry.*, 7 : 1197-1200.
- [24] Markham, K.R., Mabry, T.J., (1968). An ultraviolet spectral detection of ortho- dihydroxyl flavonoids. *Phytochemistry.*, 7: 1197.
- [25] Harborne, J.B., (1988). The flavonoids, *Advances in research since*, Chapman & Hall. London.
- [26] Harborne, J.B., (1973). *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, London.
- [27] Markham, E.R., Geiger, H., (1994). ^1H NMR spactrosopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide, in flavonoids, Harbone. London.

Chapitre III

Etude phytochimique de l'espèce *Ormenis mixta*



I. Les étapes d'une étude phytochimique

Une étude phytochimique d'une plante passe impérativement par les étapes suivantes :

- Récolte de la plante.
- Extraction.
- Screening phytochimique.
- Séparation et purification.
- Identification structurale des produits isolés.
- Activité anti bactérienne.

I.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes (feuilles et fleurs). La plante a été récoltée dans la région de Jijel au mois de mars 2017. Les parties aériennes de la plante ont été séchées dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires pendant quinze jours avant utilisation. Elles ont été bien broyées en petites morceaux et pesées (200g).

I.2. Extraction

I.2.1. Principe et la méthode d'extraction

L'extraction des principes actifs est effectuée par la macération, qui est une opération consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant (éthanol / eau) pour en extraire les principes actifs, est une extraction qui se fait à température ambiante. Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [1].

Suivant le protocole d'extraction [2], le matériel végétal broyée (200g) est conservé dans un flacon en verre ombrée, il est soumis à une extraction par macération à température ambiante dans le mélange hydroalcoolique (éthanol / eau ; 80/20 ; v/v) (figure1) pendant 72 heures avec agitation de temps en temps, cette macération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après filtration à l'aide d'un coton. Le filtrat est évaporé presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif (la figure 2). L'extrait hydroéthanolique est dilué avec 200 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation).



Figure 1 : La plante pendant la macération.

La phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par le chloroforme (200 ml x3) puis l'acétate d'éthyle (200 ml x3) et en dernier le n-butanol (200 ml x3).

La phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les différentes phases récupérées (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) sont évaporées à sec au moyen d'un évaporateur rotatif puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation. La figure 2 représente le protocole d'extraction de la plante.

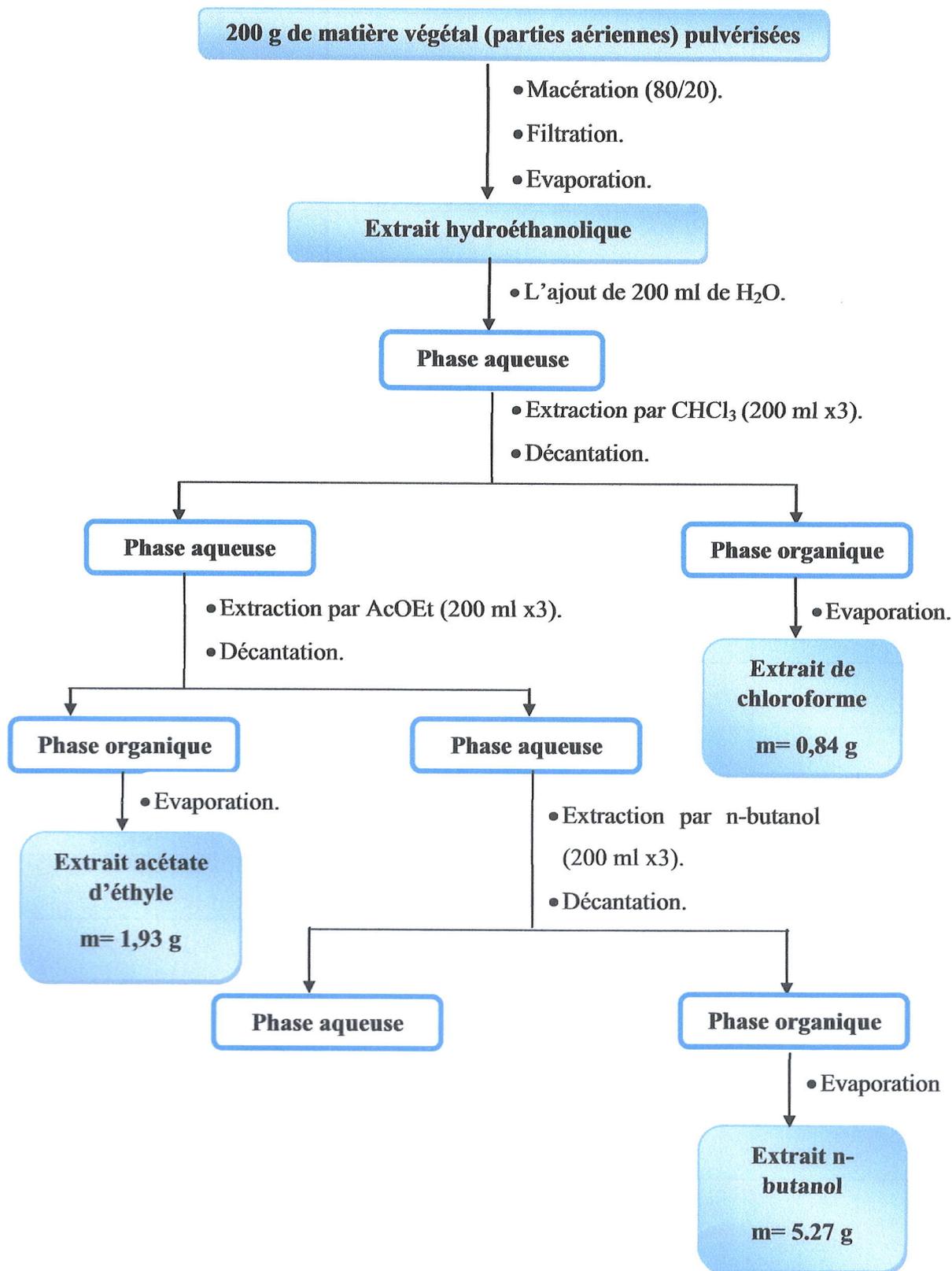


Figure 2 : Protocole d'extraction de l'*Ormenis mixta*.

I.2.2. Détermination de rendement

Le rendement des extraits à été calculé par la formule suivant :

$$R (\%) = 100 \text{ m ext} / \text{m plante.}$$

Ou :

R : Le rendement en (%).

m ext : Est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme.

m plante : Est la masse de la plante sèche en gramme [3].

I.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires dans les différents extraits obtenus de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité ou un changement de couleur spécifique [4,5]. Les tests phytochimiques pour les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les triterpènes, et des alcaloïdes ont été réalisés par différents méthodes.

I.3.1. Les polyphénols

Les extraits (CHCl_3 , AcOEt, n-BuOH) ont été traités avec 3 gouttes de solution de chlorure ferrique FeCl_3 (1%). La formation de la couleur noire ou verte indique la présence des polyphénols.

I.3.2. Les flavonoïdes

Dans chacun de nos extraits (CHCl_3 , AcOEt, n-BuOH), on ajoute 1 ml de l'acide chlorhydrique (HCl), 1 ml de l'eau distillée et 0.2g de magnésium (Mg), la solution d'extrait prend la couleur rose orange (flavone) ou rose violacée (flavonone) ou rouge cerise (flavonol) apparaît sur la couche surnageante du mélange; ce qui indique la présence d'un flavonoïde libre.

I.3.3. Les tanins

Les tanins catéchiques sont identifiés par le réactif de Stiansy (10 ml de formaldéhyde + 5ml d'acide chlorhydrique concentré). L'ajout de 5 ml de ce réactif à 10mL de chaque extrait (CHCl_3 , AcOEt, n-BuOH) entraîne la formation d'un précipité rouge caractérise les tanins catéchiques.

I.3.4. Les triterpènes

Les triterpènes ont été traités par la réaction de Liebermann-Burchard. Nous avons mis dans chacun de nos extraits (CHCl_3 , AcOEt, n-BuOH) 0.5 ml d'anhydride acétique puis 0.5 ml de

chloroforme après dissolution, les solutions sont reprises dans des tubes à essai dans lequel sont coulés 0.5 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré. L'apparition d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageant de vert ou de violet indique une réaction positive.

I.3.5. Les alcaloïdes

En présence de quelques gouttes du réactif de Dragendorff (composé d'un mélange de 0.80 g de nitrate de Bismuth, 10 ml d'acide acétique glacial et 40ml d'eau distillée), la formation d'un précipité de coloration rouge-orangé dans des tubes contenant les extraits (CHCl₃, AcOEt, n-BuOH) indique également la présence des alcaloïdes.

I.4. Séparation et purification

I.4.1. Première étape de fractionnement

Nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice sur un support d'aluminium, pour les trois extraits (chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique) obtenus par extraction. La meilleure séparation obtenue était avec l'éluant Chloroforme/Méthanol. Notre choix s'est porté sur la phase d'acétate d'éthyle à cause de sa richesse en flavonoïdes.

Un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Ormenis mixta* a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice de granulométrie (GF-254 nm).

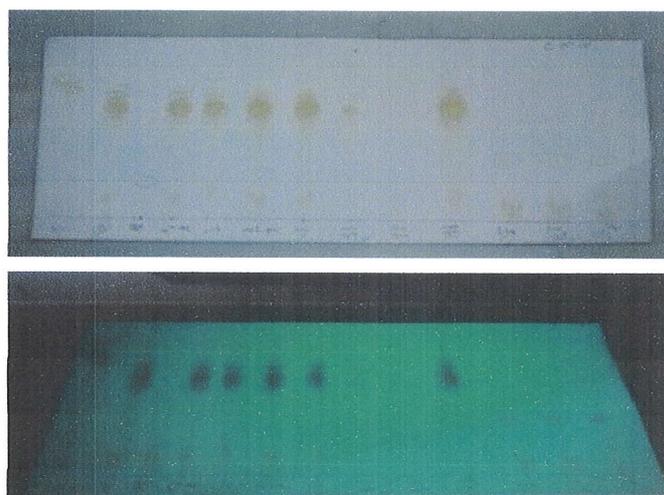
I.4.1.1. Préparation de la colonne A

Le gel de silice (GF-254nm) été préparé en mettant en suspension la silice sèche (fine en poudre blanche) et l'éluant (chloroforme) dans un bécher. La meilleure méthode est de placer le solide dans le liquide, et pas l'inverse dont la quantité de gel (poudre) nécessaire dépend de la masse d'extrait d'acétate d'éthyle, typiquement, on calcule entre 30 et 32 g de poudre de silice pour 1g d'extrait à purifier. L'élution est réalisée par deux systèmes, le premier est le chloroforme enrichi progressivement par l'acétate d'éthyle puis le deuxième est l'acétate d'éthyle enrichi progressivement par le méthanol.

Les fractions obtenues à partir de la colonne mère sont recueillies dans des tubes en verre et évaporées presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Ces fractions a été analysées par chromatographie analytique sur plaque chromatographique de gel de silice avec un système polaire (CHCl₃/MeOH/Eau) (40/9/1) (v/v/v). Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de la colonne de gel de silice est rassemblée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par chromatographie sur la colonne.

N° de la fraction	Système d'élution		
	CHCl ₃ (%)	AcOEt (%)	MeOH (%)
1-10	100	0	0
11-20	95	5	0
21-27	95	5	0
28-34	90	10	0
35-54	85	15	0
55-70	80	20	0
71-78	75	25	0
79-89	70	30	0
90-103	60	40	0
104-113	50	50	0
114-127	50	50	0
128-143	30	70	0
144-163	20	80	0
164-179	10	90	0
180-193	0	100	0
194-211	0	95	5
212-225	0	90	10
226-237	0	85	15
238-245	0	80	20
246-260	0	0	100



(CHCl₃/MeOH/Eau) (40/9/1)

Figure 3 : Les fractions séparées par CCM à la lumière visible et sous la lampe UV.

Selon les résultats donnés par les plaques chromatographiques sur gel de silice, éluées par différents systèmes décrits ci-dessus, on a pu regrouper les fractions qui ont les mêmes compositions, le tableau 2 résume le regroupement des fractions de la colonne A.

Tableau 2 : Regroupement final des fractions de la colonne A.

Lot de tubes rassemblés	N° de la fraction	Observation	Lot de tubes rassemblés	N° de la fraction	Observation
1-18	F ₁	Trainé	83-109	F ₁₀	Mélange de produits
19-22	F ₂	Mélange de produits	110-139	F ₁₁	Mélange de produits
23-25	F ₃	Mélange de produits	140-185	F ₁₂	Produit majoritaire
26-29	F ₄	Mélange de produits	186-191	F ₁₃	Mélange de produits
30-44	F ₅	Mélange de produits	192-205	F ₁₄	Mélange de produits



45-53	F ₆	Mélange de produits	206-245	F ₁₅	Mélange de produits
54-57	F ₇	Mélange de produits	246-248	F ₁₆	Mélange de produits
58-64	F ₈	Mélange de produits	249-250	F ₁₇	Mélange de produits
65-82	F ₉	Mélange de produits	251-260	F ₁₈	Mélange de produits

I.4.1.2. Traitement des Fractions obtenues

Parmi les fractions obtenues on a étudié celles qui sont simples et séparables et celles qui ont une quantité importante et on a éliminé les fractions de faibles quantités et qui sont des mélanges complexes, ainsi que les fractions qui ne contiennent pas de flavonoïdes. Pour cela nous nous sommes intéressées à la fraction F₁₀ pour réaliser une deuxième séparation sur colonne de gel de silice.

I.4.2. Deuxième étape de fractionnement

I.4.2.1. Etude de la fraction F₁₀

Afin de poursuivre la séparation et l'isolement des composés actifs, les fractions de 83 jusqu'à 109 ont été purifiées. Elles sont presque identiques et présentent une quantité importante, elles ont été réunies en une seule fraction désignée par F₁₀.

I.4.2.2. Préparation de la colonne B

La même méthode de préparation de la colonne A a été suivie ici. La fraction F₁₀ liquide dissout dans le méthanol est déposée en haut de la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de silice utilisée correspond approximativement à 30 fois le poids de l'extrait à séparer. L'élution a été réalisée par deux systèmes en mode gradient d'élution :

S1 : chloroforme 100 %.

S2 : chloroforme / méthanol (90/10) (v/v).

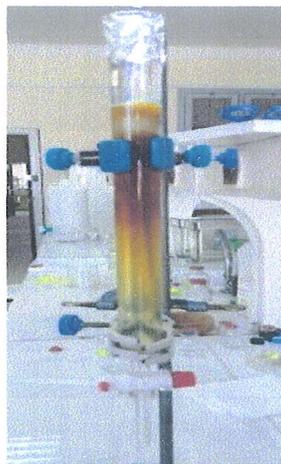


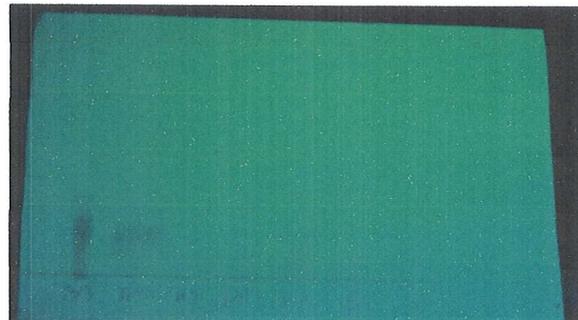
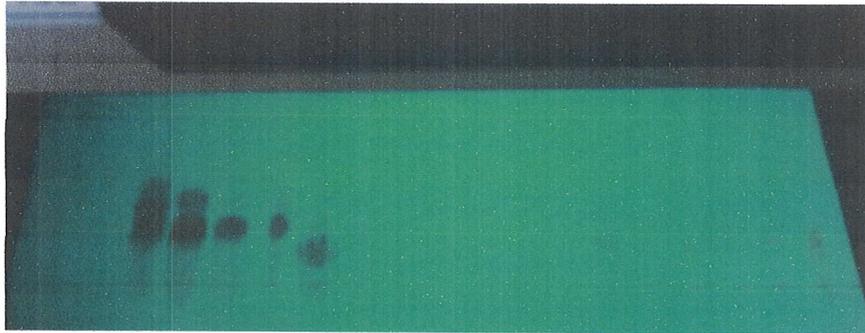
Figure 4 : Séparation de la fraction F_{10} par CC.

Le fractionnement a été fait dans des tubes après séché à sec. Ces fractions ont été contrôlées sur des plaques de gel de silice, qui après développement dans des cuves en verre avec un système polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (90/10) (v/v), nous a permis de sélectionner celles qui représentent un seul spot bien distingué sous UV à 365 nm.

Les résultats de la progression de la colonne B (tableau 3) ainsi que la séparation des fractions obtenus sur plaque CCM (figure 5) sont présentées comme suit :

Tableau 3 : Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par chromatographie sur colonne.

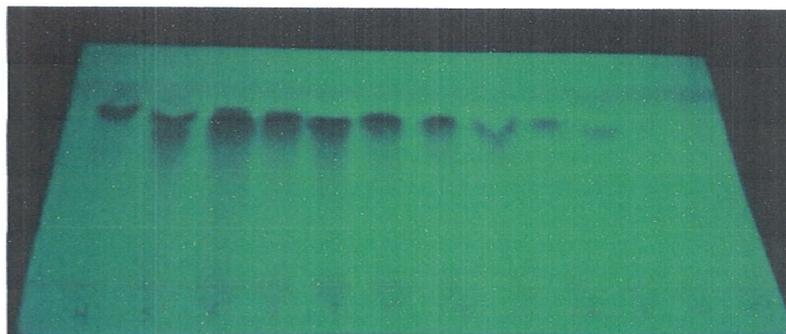
Fractions	Système d'élution	
	CHCl_3 (%)	MeOH (%)
1-45	100	0
46-116	90	10



(CHCl₃/MeOH) (90/10)

Figure 5 : Visualisation des sous-fractions séparées par CCM sous la lampe UV.

Après l'observation de ces plaques, les sous fractions F₄ jusqu'à F₁₅, ont été subi une séparation sur couche mince en utilisant l'acétate d'éthyle comme éluant.



(AcOEt) (100)

Figure 6 : Visualisation des sous-fractions séparées sous la lampe UV.

I.4.2.3. Traitement des sous-fractions obtenues

Parmi les fractions obtenues on a étudié celles qui sont simples et séparables et celles qui ont une quantité importante et on a éliminé les sous-fractions de faibles quantités et qui sont des mélanges complexes, ainsi que les fractions qui ne contiennent pas de flavonoïdes. Pour cela nous nous sommes intéressées à une seule sous fraction SF₄. Cette sous-fraction a soumise à une

purification sur plaques CCM de gel de silice par un système d'éluion (AcOEt/Hexane) (80/20) (v/v), puis visualiser sur la lampe UV à 254 et 365 nm.

Les résultats de cette purification sont présentés ci-dessous :



(AcOEt /Hexane) (80/ 20)

Figure 7 : Les sous-fractions séparées par CCM sous la lampe UV.

- **Sous fraction SF₄ :** La sous fraction SF₄ montre en CCM un composé majoritaire de coloration noire violette sous la lampe UV. Après purification et évaporation à sec, nous avons obtenu 50 mg de produit.

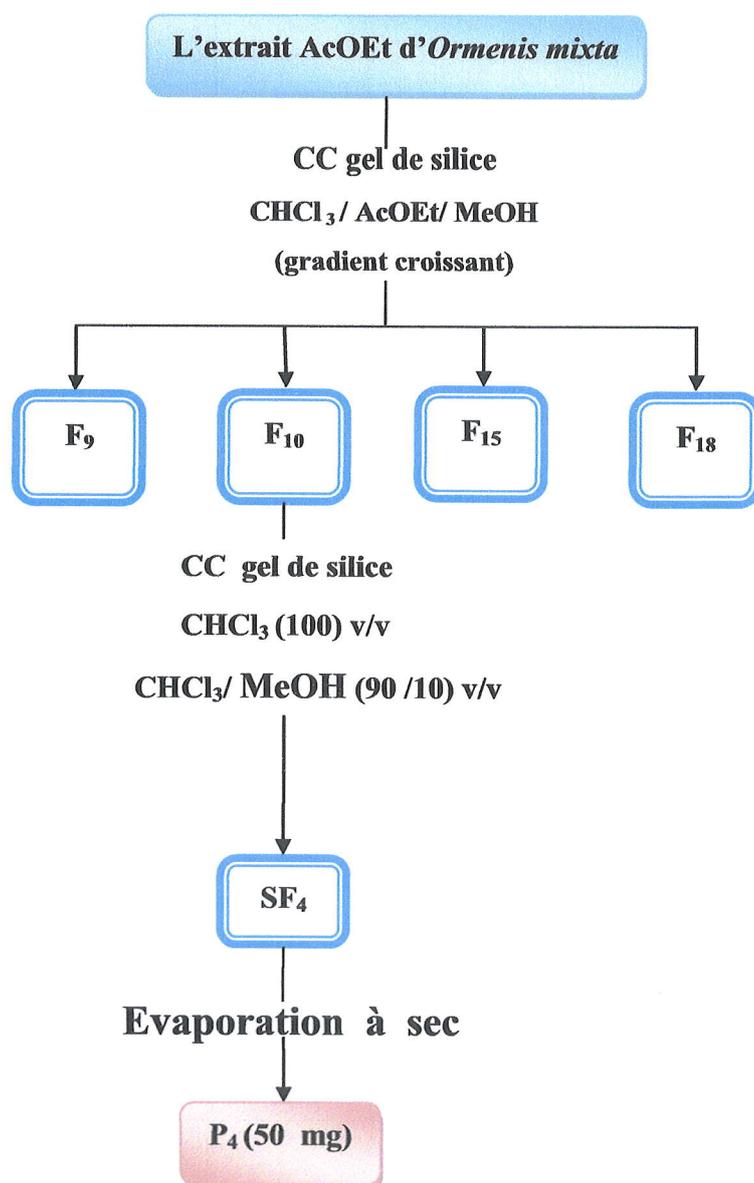


Figure 8 : Protocole de séparations chromatographiques effectuées sur l'extract d'acétate d'éthyle.

Le composé isolé a été étudié jusqu'à la détermination structurale de ces principaux composants par les analyses spectrales, particulièrement la RMN ^1H et UV-Visible sans négliger les autres caractéristiques physicochimiques (R_f et la fluorescence sous lumière de Wood).

I.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante

Nous avons étudié *in vitro* l'effet antibactérienne des flavonoïdes isolés d'*Ormenis mixta* par la méthode de diffusion des disques [6] sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos extraits : chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanolique est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavoniques à tester vis-à-vis de cinq germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) après 18 à 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C pour le développement du germe.

I.5.1. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

Lorsqu'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique [7].

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'un extrait est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, l'extrait a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- S'il y a absence de croissance bactérienne, l'extrait présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche.

❖ La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur [8].

I.5.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Les infections bactériennes sont généralement traitées par des antibiotiques. Mais la très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules antibactériennes a entraîné la sélection de souches multirésistantes. Nous avons testé nos extraits contre cinq bactéries (Gram+, Gram-).

Tableau 4 : Les caractéristiques des souches utilisées et les principales maladies qu'ils peuvent causer chez l'homme.

Espèce microbienne	Caractéristiques	Maladies provoquées
<i>Escherichia coli</i>	Bacille aérobie, mobile, gram négatif, pathogène.	Diarrhées, infection Urinaire, méningite, Septicémies...
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille aérobie, Gram négatif et très mobile.	Infections nosocomiales, méningite...
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacille aérobie, Gram négatif et très mobile.	Infections urinaires, et cutanée...

<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram positif, mobile.	Listériose , méningite...
<i>Bacillus cereus</i>	Gram positif, aérobie et anaérobie facultative.	Méningite, endocardite...

I.5.3. Les milieux de culture

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- La gélose nutritive (Cœur-Cerveille) : Pour l'isolement et pour avoir des proliférations rapides des bactéries conservées.
- La gélose Mueller Hinton : Pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits d'*Ormenis mixta*.

I.5.4. Méthode de diffusion en milieu solide

C'est une technique utilisée [9] en bactériologie médicale appelée méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélose. La technique consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne à partir d'utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zones d'inhibitions. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'extrait sur la souche testée [9].

I.5.5. Préparation des dilutions d'extraits d'*Ormenis mixta*

Pour chaque extrait nous avons utilisé une masse de 20mg, diluée dans 10 ml de DMSO dite solution mère (SM) 2000 µg/ml à partir de laquelle nous préparons une série de dilutions, voir le tableau.



Tableau 5 : Les différentes dilutions avec les concentrations finales.

	SM	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Volume (ml)	/	6.4	2	1	0.5	0.5	2	1
Volume ajouté DMSO (ml)	/	3.6	2	3	3.5	7.5	2	3
Concentrations finales ($\mu\text{g/ml}$)	1280	640	320	160	80	40	20	10

I.5.6. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

I.5.7. Ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger le maximum d'eau.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.
- Numéroter la base de chaque boîte de pétri avec des numérotations convenant au nombre de dilution.
- Placer les disques de papier Whatman de 6 millimètres de diamètre aseptiquement (avec une pince stérilisée à chaque fois dans le bec bunsen) dans les boîtes de pétri.
- A l'aide d'une micropipette, prélever 15 μl de chaque dilution de l'extrait et mettre sur les disques de papier Whatman.

I.5.8. Lecture et analyse

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du papier Whatman contenant l'extrait à tester. La lecture s'effectue par :

- La mesure du diamètre d'inhibition observé.

- Lire les concentrations minimales inhibitrices (CMI) : Petite concentration pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible.

- Classification des bactéries dans l'une des catégories : Sensible, résistante ou intermédiaire.

Trois cas sont possibles [10] :

- Souche résistante : Absence de zone d'inhibition.
- Souche sensible : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10 mm.
- Souche intermédiaire : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10 mm.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Guezal, H., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, ed CNRS , Paris , Tome2.
- [2] Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R., Bayet, C., et Voirin, B., (1995). Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* . *Phytochemistry.*, 38 (3) : 637-640.
- [3] Falleh et al, 2008.
- [4] Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., Vlietinck, A.J., (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.*, 61: 57-65.
- [5] Longaga, A., Otshudi.Vercruysse, A., Foriers, A., (2000). Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomola area, Democratic Republic of Congo (RDC). *Journal of Ethnopharmacology.*, 71 : 411-423.
- [6] CCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard. ed11. M02-A11. 32 (1) Wayne, USA.
- [7] Abdesselam, Z., (2006). Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.* ed Fondation pour le libre choix., 6 : 16.
- [8] Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., (2000). Letters in appl ,microbiol., 30 : 294-297.
- [9] Méthode de Kirby-Bauer, (1966).
- [10] Robert.dernet, S., (1995). Antibiotique et antibiogrammes . ed,Vigot , Paris., 233.

Chapitre IV

Résultat et discussion

Ormenis mixta est une plante médicinale de la famille des Astéracées (composées), elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles digestives, anxiolytique et rééquilibrante du système nerveux central et pour les insuffisances hépatiques et gastriques légères et les colites colibacillaires...etc [1].

De nombreuses études phytochimiques de cette espèce [1], ont révélé la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins, les huiles essentielles; ce qui confère à cette plante de nombreuses propriétés biologiques [2].

Etude phytochimique

I. Extraction

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne d'*Ormenis mixta* a été effectuée par des solvants à polarité croissante, il s'agit de chloroforme, acétate d'éthyle et le n-butanol. Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits : l'extrait chloroformique (ECH), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAC) et l'extrait n-butanolique (EBU).

Les trois extraits sont obtenus par macération dans l'éthanol-eau. Le rendement de ces extraits a été déterminé par rapport au matériel végétal sec, et exprimés en pourcentage de masse (%) (tableau1), le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait butanolique (2.63 %), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (0.96 %), et enfin l'extrait de chloroforme possède le plus faible rendement avec (0.42 %). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (tableau2).

Tableau 1 : Rendement des extraits.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
200 g	Chloroforme	0.84	0.42
	Acétate d'éthyle	1.93	0.96
	n-butanol	5.27	2.63

Tableau 2 : Couleur et aspect de différents extraits d'*Ormenis mixta*.

L'extrait	La couleur	L'aspect	L'odeur
Chloroformique	Vert foncé	Pâteux	Forte caractéristique.
Acétate d'éthyle	Marron	Pâteux	
Butanolique	Marron orangé	Pâteux	

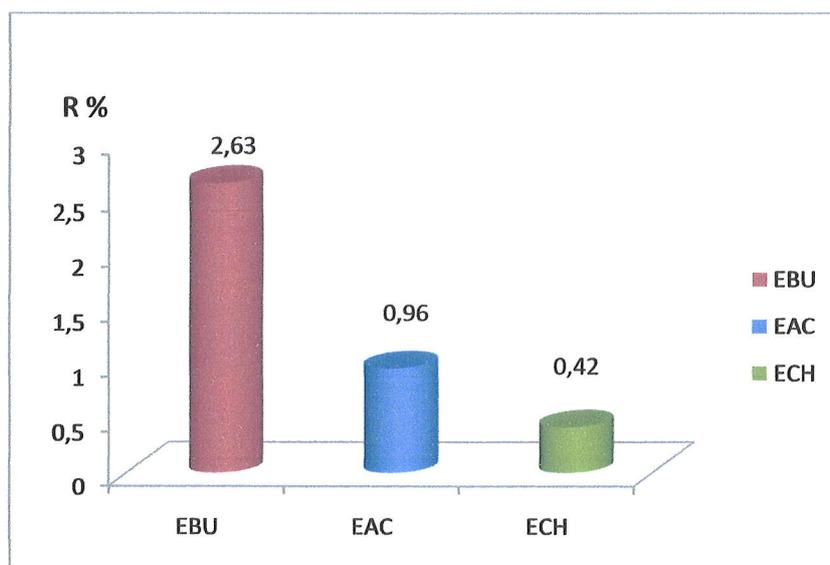


Figure 1 : Rendement des extraits.

➤ Discussion

Le calcul de rendement d'extraction de la plante révèle un grand écart d'un extrait à l'autre. En effet il est difficile de comparer les valeurs de nos rendements avec d'autres études, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des plants ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée [4].

II. Screening phétochimique

Les études de screening phytochimique effectuées sur les trois extraits obtenus après extraction ont donné les résultats présentés ci-dessous :

Tableau 03 : Résultats de screening phytochimique d'*Ormenix mixta*.

Métabolites secondaires	Extraits		
	ECH	EAC	EBU
Polyphénols	-	+	+
Flavonoïdes	-	+	+
Tanins	-	-	-
Triterpènes	-	+	+
Alcaloïdes	-	+	+

Test négatif (-), Test positif (+).

II.1. Les polyphénols

La formation de la couleur noir pour l'extrait de n-butanol ainsi que la couleur verte pour l'extrait d'acétate d'éthyle (figure 2) indique la présence des polyphénols dans notre plante.

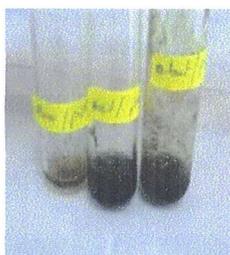


Figure 2 : Détection chimique des polyphénols.

II.2. Les flavonoïdes

L'apparition d'une couleur rose orange (figure 3) sur la couche surnageant des deux extraits, n-butanolique et l'acétate d'éthyle, signifie que la plante étudiée (*Ormenis mixta*) contient des flavonoïdes en particulier c'est un flavone.

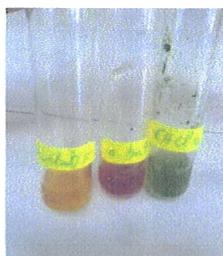


Figure 3 : Détection chimique des flavonoïdes.

II.3. Les tanins

On observe l'absence de formation d'un précipité rouge pour les trois extraits (figure 4), celle-ci indique que la plante *ormenis mixta* ne contient pas des tanins catéchiques.

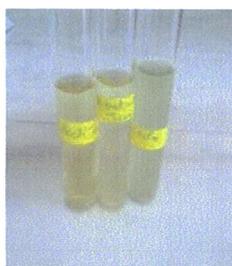


Figure 4 : Détection chimique des tanins.

II.4. Les triterpènes

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageant en violet pour les deux extraits n-butanol et acétate d'éthyle confirme la présence des triterpènes.



Figure 5 : Détection chimique des triterpènes.

II.5. Alcaloïdes

On observe la formation d'un précipité de coloration rouge orangé (figure 6), donc, on peut conclure la présence des alcaloïdes dans notre plante.

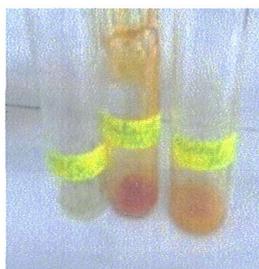


Figure 6 : Détection chimique des alcaloïdes.

➤ Discussion

Le screening phytochimique réalisé sur la partie aérienne de la plante *Ormenis mixta*, a révélé la présence des polyphénols, des flavonoïdes en quantités importantes, des triterpènes et des alcaloïdes. Cependant, nous observons l'absence des tanins catéchiques. La plante produit plusieurs types de métabolites secondaires afin de se défendre aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux [4] et pouvoir subsister aux contraintes imposées par le climat et le milieu [5].

L'ensemble des groupes chimiques ainsi identifiés, ayant des propriétés pharmacologiques diverses [6]. Ce qui justifier l'utilisation multiple d'*Ormenis mixta* en tradi-thérapeutique.

La présence des polyphénols, donne à la plante des propriétés vasculoprotectrices, antispasmodiques et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant.

En effet les flavonoïdes jouent un rôle dans la coloration des végétaux [7], aussi ils possèdent des rôles très importants dans les plantes, dont elles protègent les plantes contre le stress hydrique et génère une tolérance des plantes aux métaux lourds présente dans les sols. Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques [8]. Les flavonoïdes protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radriculaire [8].

La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses [9]. Ils jouent; à faibles doses, le rôle d'anesthésique locaux, d'analgésique, d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'antipaludique, d'anti-tumoraux [10].

III. Identification structurale des produits isolés d'espèce *Ormenis mixta*

III.1. Elucidation structurale du composé P₄

III.1.1. Comportement chromatographique

Le produit P₄ a été élué sur une plaque de gel de silice, avec deux systèmes différents, pour calculer le R_f (tableau 4).

S 1: (AcOEt) (100).

S 2: (AcOEt /Hex) (80/20).

Tableau 4 : Valeurs des rapports frontaux du produit P₄ dans les deux systèmes S1 et S2.

Système	(AcOEt) (100)	(AcOEt /Hex) (80/20)
R _f	0,79	0,80
Fluorescence sous lumière de Wood	Noire-violette	

Le comportement chromatographique dans les différents systèmes indique que le composé est un aglycone.

La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

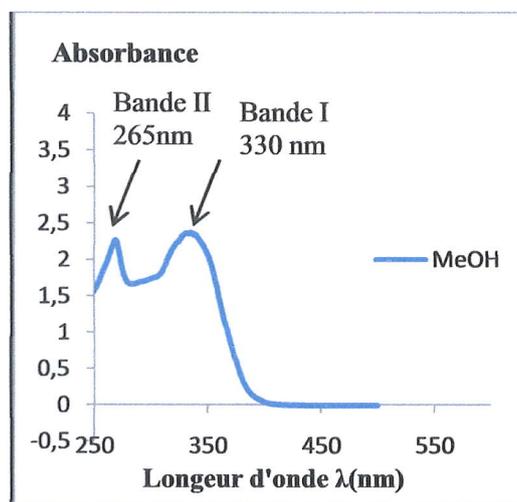
III.1.2. Données spectroscopiques

III.1.2.1. Spectre UV-visible

Les données spectrales UV-visible obtenues après enregistrement dans le méthanol et en présence des réactifs spécifiques sont présentés dans le tableau 5 (figure 7)

Tableau 5 : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P₄.

Réactifs	Bande I λ_{\max} (nm)	Bande II λ_{\max} (nm)	Autres Bandes λ_{\max} (nm)	Interprétation
MeOH	330	265	/	Flavone
MeOH+NaOH	395	272	321,368	OH en C-4' OH en C-7
MeOH+AlCl ₃	382	272	349,295	OH libre en C-5
MeOH+AlCl ₃ /HCl	383	272	295,343	/
MeOH+NaOAc	350	269	298	OH en 7
MeOH+NaOAc/H ₃ BO ₃	339	265	/	/
Spectre stable avec NaOH après 5min				



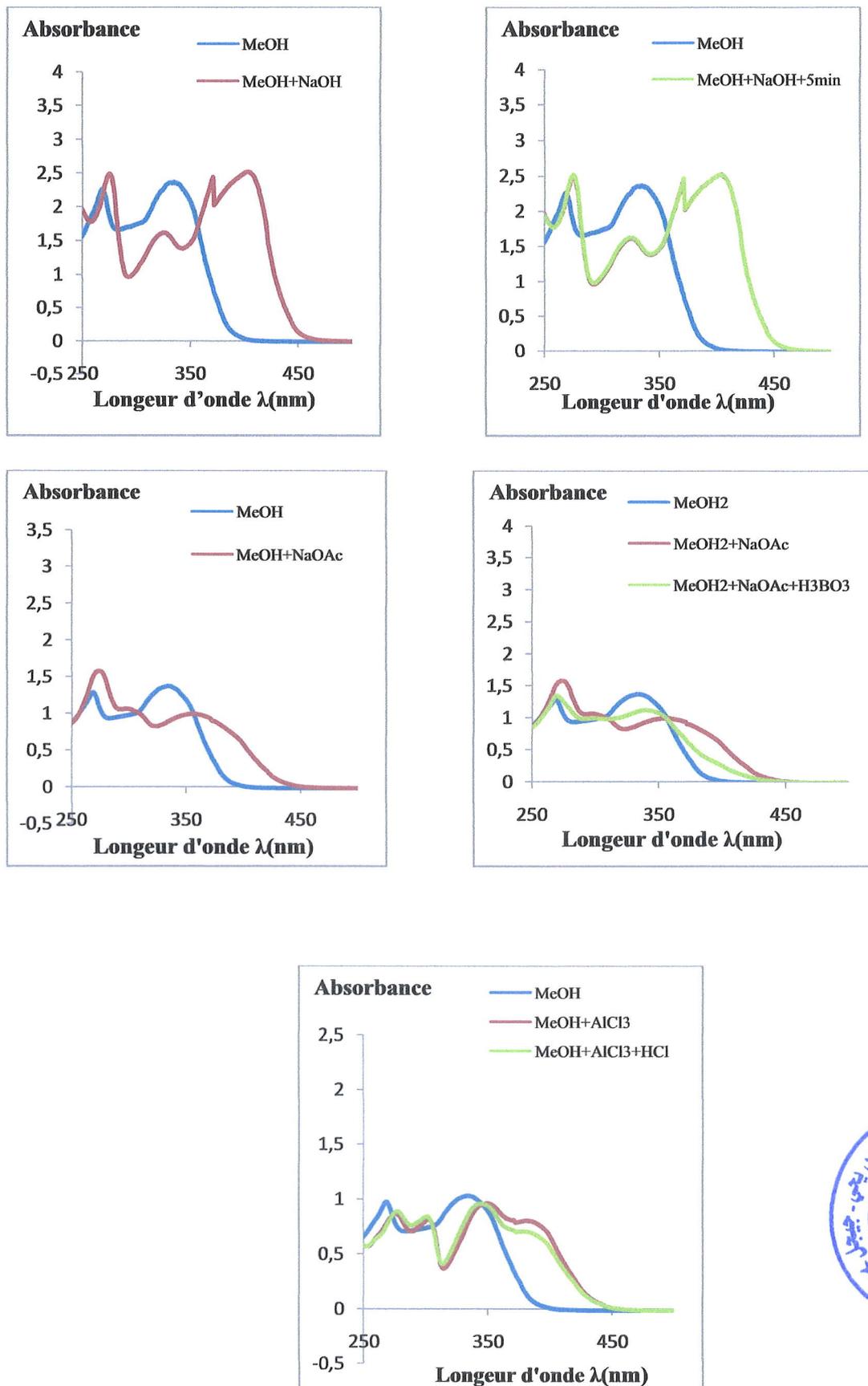


Figure 7 : Spectres de la série spectrale UV-visible du composé P₄.



L'interprétation des spectres UV-visible obtenus nous a permis de tirer les constatations suivantes :

- Le spectre enregistré dans le MeOH donne la valeur $\lambda_{\max} = 330$ nm de la bande I, indique qu'il s'agit d'un flavonol (3-OR) ou flavone.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +65$ nm) sans diminution de l'intensité optique, ce qui oriente vers un 4'-OH libre.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement de la bande II, ce qui indique que la position 7 comporte un substituant OH.
- L'examen du spectre enregistré dans le milieu $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparé avec celui enregistré dans le AlCl_3 montre qu'il n'y a pas de changement de la bande I, donc il n'y a pas un *ortho*-di-OH sur le cycle B. Ce qui indique que la position 5 porte un substituant OH.

Ces données nous orientent vers la structure partielle du produit P_4 représentée dans la figure 8 :

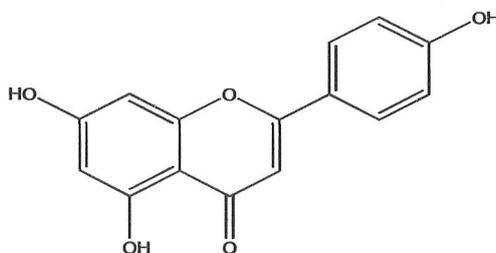


Figure 8 : Structure partielle du produit P_4 .

Cette structure va être complétée à l'aide des données spectroscopiques RMN¹H.

III.1.2.2. Spectre RMN¹H

Le spectre RMN¹H enregistré dans CD_3OD à 250 MHz (figures 9 et 10), donne les informations suivantes :

- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta = 7,90$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,65$ Hz (*ortho*), attribué à H-2' et H-6' du noyau B d'un flavonoïde (deux protons magnétiquement équivalents).
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta = 7,06$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,65$ Hz (*ortho*), attribué à H-3' et H-5' du noyau B d'un flavonoïde (deux protons magnétiquement équivalents).
- Deux signaux à $\delta = 6,25$ ppm ($J = 2$ Hz) et $\delta = 6,55$ ppm ($J = 2$ Hz) sous forme de doublet d'intégration 1H, les deux caractéristiques de H-6 et de H-8, respectivement, du cycle A d'un flavonoïde.

- Un signal sous forme de singlet d'intégration 1H, à $\delta = 6,65$ ppm, attribué au proton H-3 du cycle C d'un flavonoïde.

Tableau 6 : Données de la spectroscopie de RMN ¹H (CD₃OD, 250 MHz) du composé P₄.

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
7.90	2H	d	8.65	H-2', H-6'
7.06	2H	d	8.65	H-3', H-5'
6.65	1H	s	-	H-3
6.55	1H	d	2.00	H-8
6.25	1H	d	2.00	H-6

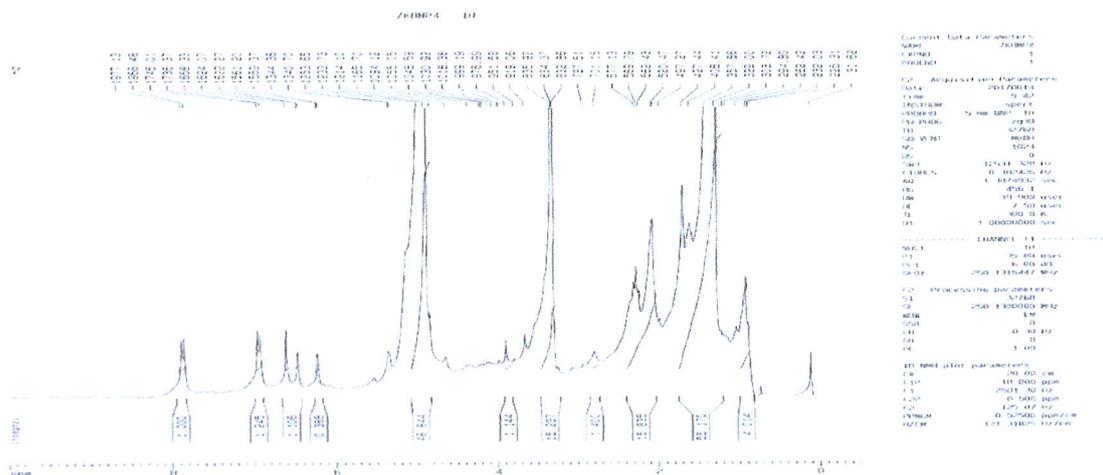


Figure 9 : Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 250 MHz) du produit P₄.



Figure 10 : Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 250 MHz) du produit P₄ étalé.

La combinaison de l'ensemble de ces données mène à la structure de la 4',5, 7-trihydroxy flavone connue sous le nom apigénine reportée dans la figure 10

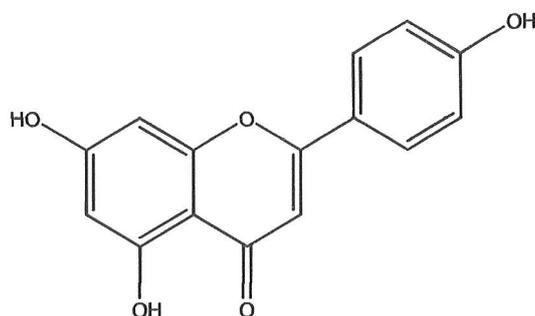


Figure 11 : Structure finale du produit P₄ : 4', 5, 7-trihydroxyflavone ou apigénine.

IV : Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de plante dissouts dans le DMSO a été évaluée sur les différentes souches bactériennes gram positives, gram négatives à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton. Les résultats des différentes dilutions présentés dans les tableaux 7 montrent que l'extrait chloroformique, butanolique et l'acétate d'éthyle de l'*Ormenis mixta* ont des activités antibactériennes de degrés variables contre les souches des différents micro-organismes testés (figure 12, 13, 14).

Tableau 7 : Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle.

Diamètre d'inhibition en mm								
Souches	Phase acétate d'éthyle							
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
<i>Listeria</i>	11	10	10	10	10	10	6	6
<i>Pseudo</i>	11	11	10	10	9	-	-	-
<i>E.coli</i>	10	8	8	8	8	8	8	7
<i>Bacillus</i>	9	9	9	9	8	8	7	7
<i>Proteus</i>	9	7	7	7	7	7	-	-

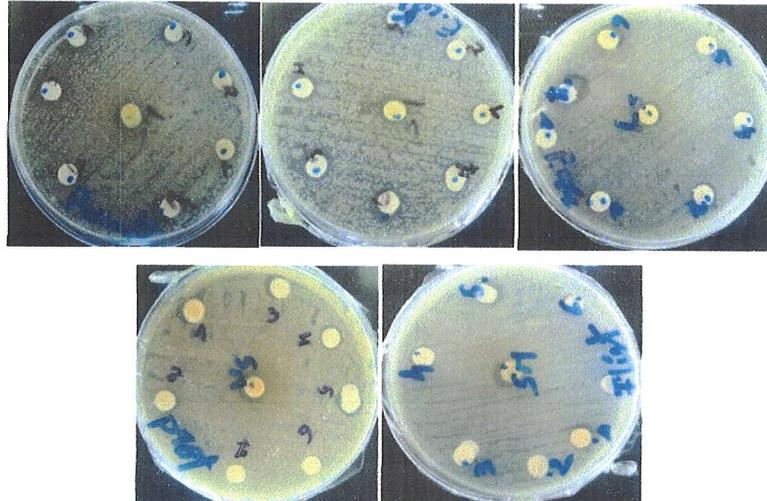


Figure 12 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle sur les cinq souches bactériennes

Tableau 8 : Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanolique.

Diamètre d'inhibition en mm								
Souches	Phase butanolique							
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
<i>Proteus</i>	12	12	10	10	10	9	9	9
<i>Pseudo</i>	12	11	11	11	9	9	9	-
<i>E.coli</i>	11	11	10	10	10	10	8	8
<i>Bacillus</i>	11	11	10	10	10	9	9	9
<i>Listeria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

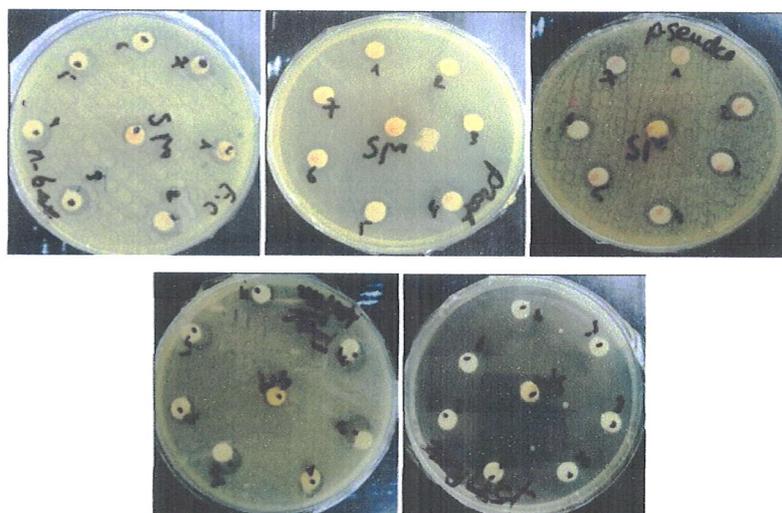


Figure 13 : Effet de l'extrait butanolique sur les cinq souches bactériennes.

Tableau 9 : Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique.

Diamètre d'inhibition en mm								
Souches	Phase chloroformique							
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
<i>E.coli</i>	10	10	10	10	10	9	9	-
<i>Listeria</i>	10	10	10	10	10	10	-	-
<i>Bacillus</i>	10	8	8	7	7	7	-	-
<i>Proteus</i>	9	9	9	-	-	-	-	-
<i>Pseudo</i>	10	-	-	-	-	-	-	-

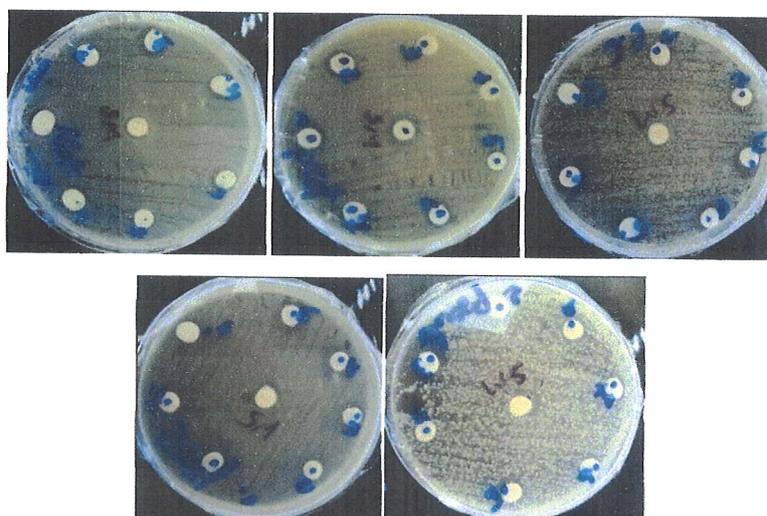


Figure 14 : Effet de l'extrait chloroformique sur les cinq souches bactériennes.

Les résultats présentés dans les tableaux 7, 8, 9 (figure 12, 13, 14) montrent que les extraits ont des activités antibactériennes de degrés variables contre les souches des différents micro-organismes testés.

➤ Discussion

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches bactériennes testées ce qui confirme que la plante d'*Ormenis mixta* est douée des propriétés antibactériennes.

L'activité inhibitrice des extraits a été identifiée dans une large gamme de concentrations allant de 10 à 1280 µg/ml. Parmi les trois extraits testés l'extrait acétate d'éthyle est ce qui a montré l'activité antibactérienne la plus élevée.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre, cette zone varie de 6 mm à 12 mm (tableau 7, 8, 9). La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

- **L'extrait acétate d'éthyle**

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 7 et 10 mm pour *Echerichia coli* ATCC, 9 à 11 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, 6 à 11mm pour *listeria monocytogenes* ATCC, et entre 7 à 9 pour *Prouteus mirabilis* ATCC et *Bacillus cereus* sur milieu MH.

L'extrait de l'acétate d'éthyle montre un effet inhibiteur de *Pseudomonas aeruginosa* à la dilution D4 ce qui correspond une concentration CMI équivalente à 80 µg/ml. Par contre, pour les autres souches, on a observé une prolifération bactérienne, on obtient ainsi :

Pour *Prouteus mirabilis* ATCC la CMI correspondant à la 5^{ème} dilution d'une concentration égale à 40 µg/ml.

- **L'extrait butanolique**

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 8 et 11 mm pour *Echerichia coli* ATCC, 9 à 12 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, 8 à 12 pour *Prouteus mirabilis* ATCC et 9 à 11 pour *Bacillus cereus*.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC la CMI correspondant à la 6^{ème} dilution d'une concentration égale à 20 µg/ml.

Il s'est avère qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, cette bactérie possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de l'extrait butanolique d'*Ormenis mixta*.

- **L'extrait chloroformique**

La souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* plus résistante que *prouteus mirabilis* suivi par *Bacillus cereus* puis *Listeria monocytogenes*, et dernièrement *Echerichia coli*.

L'extrait de chloroformique montre un effet inhibiteur de *Pseudomonas aeruginosa* à solution mère ce qui correspond une concentration CMI équivalente à 1280 µg/ml. Par contre, pour les autres souches, on a observé une prolifération bactérienne, on obtient ainsi :

-Pour *Prouteus mirabilis* ATCC la CMI correspondant à la 2^{ème} dilution d'une concentration égale à 320 µg/ml.

-Pour *Echerichia coli* ATCC la CMI correspondant à la 6^{ème} dilution d'une concentration égale à 320 µg/ml.

-Pour *Listeria monocytogenes* ATCC la CMI correspondant à la 5^{ème} dilution d'une concentration égale à 40 µg/ml.

-Pour *Bacillus cereus* ATCC la CMI correspondant à la 5^{ème} dilution d'une concentration égale à 40 µg/ml.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* révèle la plus résistante pour les deux extraits acétate d'éthyle et chloroformique. La souche de *Listeria monocytogenes* est plus résistante pour l'extrait butanolique.

Les résultats obtenus ont indiqué l'existence de composés antibactériens de nos extraits testés et ont montré également une bonne corrélation entre l'utilisation de cette plante révélée en médecine traditionnelle contre les maladies infectieuses.

L'activité bactérienne évaluée par les tests *in vitro*, il ressort que les flavonoïdes possèdent un pouvoir antibactérien important sur les germes multirésistants responsables des maladies infectieuses. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, de la nature et de la concentration du produit testé et aussi du milieu de culture.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Pascual et al., (1984) ; Rauter et al ., (1989) ; Joao et al ., (1998) ; Akrouit et al., (2001).
- [2] Akroums., (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels .
Thèse de Doctorat en sciences ,Université Mentouri de Constantine. Algérie. 113.
- [3] Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, C. ., (2003) . Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than theas and red wine journal.
- [4] Mohammadi, (2013). Agriculture and Food Chemistry., (3) : 7292-7295 .
- [5] Rita, M., (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'avtivité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magistre en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Canstantine . Algérie ., 94
- [6] Ouedraogo, Y., Nacoulma, O., Guisou, Guede, I.P., et Guina, F., (2001). Evalutation in vivo et in vitro de la toxicite des extraits aqueus d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (wilid) , OKtz (rubiaceae) , Pharm, Méd ,Trad., 11 : 13-27.
- [7] Ribereau.Gayon, J., Peynaude, E., (1968). Les composés phénoliques des végétaux, ed Dunod, Paris. France., 254.
- [8] Makhloufi., (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre. Thèse de doctorat d'état en biologie, université aboubaker belkaid, Tlemcen . Algérie.,136 .
- [9] Milcent, R., Chau, F., (2003). Chimie organique hétérocyclique : structure fondamentale , chimie et biochimie des principaux composés naturels, ed Francois chau EDP ,Paris. France., 846.
- [10] Chenni, (2010). Contribution à l'étude chimique et écologique de la racine d'une plante médicinale., *Bryonia dioica Jacp*. Thèse de Magister, Université d'Oranes-Senia, Oran.Algérie., 138.
- [11] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., and Tillequin, F., (2003). Flavonoids aglycones from *Centaurea napifolia*. Chemistry of Natural Compounds., 39(2): 165-166.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objet de notre étude a porté sur l'étude phytochimique, biologique (activité anti bactérienne) et structural portant sur l'investigation de la phase acétate d'éthyle d'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de la plante *Ormenis mixta* appartenant à la famille des astéracées.

Après extraction hydroalcoolique des parties aériennes de cette espèce, concentration et affrontement au chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol successivement, nous avons soumis les divers extraits organiques fondés sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques (chromatographie sur colonne de gel de silice, chromatographie sur couche mince).

Le screening phytochimique a montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tritérpènes et des polyphénols, et l'absence des tanins dans notre plante. La présence des composants précédents due à leur rôle important dans la plante, dont ils sont des produits considérés comme métabolites secondaires, en réponse au stress environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux.

La détermination structurale des produits isolés a été réalisée grâce à l'utilisation des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectrophotométrie UV visible, et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN de proton MHz), permis de confirmer la structure de l'Apéginine.

Des tests de l'activité antibactérienne des extraits obtenus ont montré que cette plante à une sensibilité légèrement active vis-à-vis les différentes souches testées.

Soutenue publiquement par :
LABRECHE Soumia MECHETER Meriem

Directrice de recherche :
BENTELDJOUNE Mounira

Etude phytochimique d'une plante de la famille des Astéracées

Résumé

Le but principal de notre travail concerne principalement l'étude Phytochimique de la plante *Ormenis mixta* appartenant à la famille des astéracées. Ils consistent à identifier le maximum de composés afin d'élargir et d'approfondir la connaissance phytochimique de cette plante.

Notre choix repose sur le fait que l'espèce *Ormenis mixta* a montré d'une part qu'il est douée d'activités biologiques et d'autre part que c'est une excellente accumulatrice de molécules de type flavoniques.

Pour ce faire, nous avons procédé à la séparation et à la purification des différents phytoconstituants de l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu après extraction, par différentes méthodes chromatographiques notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice et sur couche mince ce qui a permis l'isolement d'un produit pur. On a pu déterminer sa structure par la combinaison de méthodes spectrales à savoir la spectroscopie UV-visible et la RMN 1H . Il s'agit de :

- **Apigénine.**

L'activité antibactérienne des différents extraits a été testée vis-à-vis des souches Gram-positives et Gram-négative et ces dernières ont montré une différente sensibilité envers les trois extraits obtenus.

Mots clés

Astéracées, *Ormenis mixta*, Flavonoïdes, Antibactérienne.

Abstract

The main purpose of our work concerns mainly the phytochemical study of *Ormenis mixta* belonging to the asteraceae in which consist to identify the maximum of compounds to widen and to deepen the phytochemical knowledge of this plant.

Our choice was base on the fact that, this plant exhibit a wide range of biological activities and were known to contain flavonoids.

We proceeded to the separation and to the purification of the various phytoconstituants of ethyl acetate extract using various chromatographic methods in particular the column chromatography of silica gel and thin layer chromatography in which allowed us the insulation of one compound his structure were determined by the combination of spectral methods UV-visible, and RMN 1H .

- **Apigenin.**

The antimicrobial activity of the different extracts of the plant was tested against various strains of Gram-positive and Gram-negative bacter. The strains show a different sensibility against the extracts.

Key words

Asteraceae, *Ormenis mixta*, Flavonoids, Antibactery.

ملخص

الغرض الرئيسي من عملنا هو دراسة كيميائية لنبات البابونج من نوع *mixta* المصنف ضمن العائلة النجمية لتحديد العدد الأقصى من المركبات الطبيعية المكونة له ومعرفة خصائصه الكيميائية.

ويستند خيارنا على أن هذه النبتة تتميز بفعالية بيولوجية كما أنها تحتوي على أنواع ممتازة من جزيئات الفلافونويد. للقيام بذلك، أجرينا فصل وتنقية مختلف مكونات مستخلص اسيتات الايثيل الذي تحصلنا عليه بعد القيام بعملية الاستخراج، من خلال وسائل مختلفة و المتمثلة في كروماتوغرافي العمود وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة مما سمح لنا بعزل مركب واحد. الذي استطعنا تحديد بنيته الكيميائية عن طريق مزيج من الطرق الطيفية هما القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية، ومطيافية الرنين النووي.

ويتمثل هذا المركب في: **Apigénine**

واخيرا، قمنا بتجربة الفعالية المضادة للبكتيريا على سلالات بكتيريا موجبة وسالبة الغرام التي بدورها أظهرت حساسية مختلفة اتجاه مختلف المستخلصات المتحصل عليها.

الكلمات المفتاحية

العائلة النجمية، البابونج المغربي، فلافونويدات، مضادات البكتيريا.