



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Med Khider Biskra

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

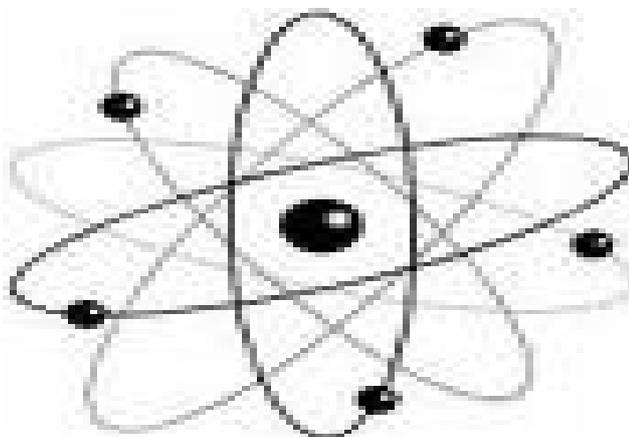


Département des Sciences de la Matière

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique



*Mémoire de fin d'étude en Master*

*Intitulé :*

*Étude phytochimique de la plante "Marrubium Vulgare L"*

*Présenté par :*

Saghiri khadidja

*Devant le jury :*

Boukraa Issam

*Université Med Khieder, Biskra*

*Président*

Benakcha Rachid

*Université Med Khieder, Biskra*

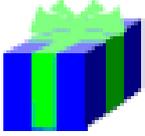
*Rapporteur*

Ouakaf Amira

*Université Med Khieder, Biskra*

*Examineur*





# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mes très chères sœurs : Khawla, Afiane et Serine*

*A mes frères : Ayman, Mchammed et Ibrahim*

*A mes amies : Zohra, Fatima, Imene, Heraiz, Souhaila ,  
Imene, Mbarki et Nawal.*

*A mes tantes : faiza, fatima , samira*

*Mes oncles : taib, Saïd, abdallah.*

## Remerciements

*Ce travail a été réalisé en trois laboratoires : laboratoire de chimie organique au université Med khider Biskra, laboratoire de microbiologie au Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA) et l'hôpital Rzig Ibrahim au Boussaâda. Sous la direction de Monsieur Benakcha Rachid.*

*Avant toute chose, je remercie Allah, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour faire aboutir ce travail.*

*Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Monsieur Benakcha Rachid qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.*

*Mes remerciements vont aussi aux membres de jury*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Boukraa Issam d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je tiens également mes vifs remerciements à Mme Oukaf Amira pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*J'aimerais également remercier Monsieur bengharbi miloud médecin microbiologiste au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Rzig Ibrahim au Boussaâda*

*aussi Je remercie vivement mawahab et hamide du laboratoire microbiologie de CRSTRA (**Ancien siège- Biskra**) pour accepter de réaliser la partie de l'activité antibactérienne.*

*J'adresse ma reconnaissance, à tous ceux qui ont de près ou de loin, contribué à l'élaboration de cette thèse.*

*Un très grand merci à ma mère pour ses encouragements et son soutien tout au long de mes études et aussi pour ses innombrables sacrifices.*

*Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de chimie l'université de Biskra pour l'aide pendant ma formation d'étude.*

# TABLE DES MATIERES

DEDICASE.....	i
REMERCIEMENT.....	ii
TABLE DE MATIERES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES SCHEMAS .....	xii
LISTE DES ABRIVIATION .....	xiii
INTRODUCTIONS GENERALE.....	iii

## CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PLANTE MARRUBIUM VULGARE L

I .1. Introduction .....	1
I .2. Plantes aromatique et médicinales .....	1
I .3. La phytothérapie .....	1
I .4. Présentation de quelques métabolites secondaires .....	1
I.4.1. Les Terpènes .....	3
I.4.2. Les huiles essentielles .....	4
I.4.3. Les alcaloïdes .....	5
I.4.4. Les Flavonoïdes .....	5
I.4.5. Les coumarines .....	7
I.4.6. Les composés phénoliques .....	8
I.4.7. Les tanins .....	9

I.4.8. Les saponines .....	11
I.4.9. Les mucilages .....	11
I.4.10. Les vitamines .....	11
I.4.11. Les anthraquinones .....	12
I.4.12. Les minéraux .....	12
I.4.13. Les glucosides .....	12
I.4.14. Les substances amères .....	12
<b>I.5. Etude botanique de la plante étudiée .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.1. Présentation de la plante .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.1.1 Présentation de la Famille des Lamiacées .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.1.2. Distribution géographique .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.1.3. Intérêt économique .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.2. Présentation du genre Marrubium .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.2.1. Aspect botanique .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.2.2. Aspect phytochimique .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.3. Présentation de l'espèce : Marrubium vulgare .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.3.1. Classification botanique .....</b>	<b>15</b>
<b>I.5.3.2. Description morphologique .....</b>	<b>16</b>
<b>I.5.3.3. Répartition géographique .....</b>	<b>16</b>
<b>I.5.3.4. Utilisation traditionnelle .....</b>	<b>16</b>
<b>I.5.3.5. Toxicité .....</b>	<b>16</b>

## **CHAPITRE II :GENERALITES SUR LES LACTONES**

### **SESQUITERPENES, METHODES DE SEPARATION ET D'ANALYSE**

<b>II.1. Introduction.....</b>	<b>17</b>
--------------------------------	-----------

<b>II.2. Généralités sur les lactones sesquiterpènes .....</b>	<b>17</b>
<b>II.3. Caractéristiques des lactones sesquiterpènes .....</b>	<b>17</b>
<b>II.4. Structures des lactones sesquiterpéniques.....</b>	<b>18</b>
<b>II.5. Biogenèse des lactones sesquiterpènes .....</b>	<b>20</b>
<b>II.6. Classification .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.1. Les lactones sesquiterpéniques acycliques .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.2. Les lactones sesquiterpéniques monocycliques .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.2. 1.Les germacranolides .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.2.2. Les héliangolides .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.2.3. Les mélampolides .....</b>	<b>23</b>
<b>II.6.2.4. Les seco-eudesmanolides-1,10 .....</b>	<b>24</b>
<b>II.6.2.5. Les élémanolides .....</b>	<b>24</b>
<b>II.6.2.6. Les xanthanolides.....</b>	<b>24</b>
<b>II.6.2.7. Les eudesmanolides .....</b>	<b>25</b>
<b>II.6.2.8. Les Guaianolides .....</b>	<b>25</b>
<b>II.6.2.9. Les pseudo-guaianolides.....</b>	<b>25</b>
<b>II.6.2.10. Les eremofilanolides .....</b>	<b>26</b>
<b>II.6.2.11. Les bakkenolides .....</b>	<b>26</b>
<b>II.6.3. Sesquiterpène lactones polycycliques .....</b>	<b>27</b>
<b>II.7. Synthèse totale des sesquiterpènes lactones .....</b>	<b>27</b>
<b>II.8. Activités biologiques des lactones sesquiterpéniques : .....</b>	<b>28</b>
<b>II.9. Rôle des lactones sesquiterpènes dans la plante.....</b>	<b>30</b>
<b>II.10. Allergie au sesquiterpènes lactones .....</b>	<b>31</b>
<b>II.10.1. Dermatite de contact allergique (DCA) .....</b>	<b>32</b>

II.10.2. Dermatite actinique chronique (DAC) .....	32
II.11. Les méthodes de séparation et d'analyse des lactones sesquiterpéniques .....	33
II.11.1. Les Méthode de séparation .....	33
II.11.1.1. Définition de la chromatographie .....	34
II.11.1.2. Chromatographie sur couche mince .....	34
II.11.1.3. La chromatographie sur colonne .....	34
II.11.1.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	36
II.11.2. Les Méthodes d'analyse .....	37
II.11.2.1. La spectrométrie UV-visible .....	37
II.11.2.2. La spectroscopie Infrarouge .....	37
II.11.2.3. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	37
II.11.2.4. La spectroscopie de mass (SM).....	38
II.11.2.5. La diffraction des rayon X (DRX) .....	38

### CHAPITRE III : L'ETUDE EXPERIMENTALE

III.1. INTRODUCTION .....	39
III.2. Etude phytochimique .....	39
III.2.1. Le matériel végétal .....	39
III.2.2. Extraction des sesquiterpène lactones .....	39
III.2.2.1. Extraction par macération .....	39
III.2.2.2. Extraction liquid-liquid (liq-liq) .....	40
III.2.2.2. 1.Extraction par l'éther de pétrole .....	41
III.2.2.2.2. Extraction par le chloroforme .....	41
III.2.3. Évaporation sous vide .....	42
III.2.4. 1.analyse par CCM .....	45

<b>III.3. Etude de L'activité antibactérienne .....</b>	<b>47</b>
<b>III.3. 1.Généralités sur les bactéries et les antibiotiques .....</b>	<b>47</b>
<b>III.3. 2.Les antibiotiques.....</b>	<b>47</b>
<b>III.3. 3.Les cibles bactériennes des antibiotiques.....</b>	<b>47</b>
<b>III.3.4. Principales caractéristiques des souches testées.....</b>	<b>48</b>
<b>III.3.5.1. Escherichia coli .....</b>	<b>48</b>
<b>III.3.5.2. Staphylococcus aureus .....</b>	<b>49</b>
<b>III.3.5.3. Pseudomonas aeruginosa.....</b>	<b>49</b>
<b>III.3.5.4. Bacillus Cereus .....</b>	<b>50</b>
<b>III.3.6. Méthode de diffusion en milieu gélose.....</b>	<b>50</b>
<b>III.3.6.1. Les milieux de culture .....</b>	<b>50</b>
<b>III.3.6.2. Préparation des dilutions des extraits .....</b>	<b>50</b>
<b>III.3.6.3. Préparation des disques.....</b>	<b>50</b>
<b>III.3.6.4. Préparation le milieu du culture.....</b>	<b>51</b>
<b>III.3.6.5. Inoculum .....</b>	<b>51</b>
<b>III.3.6.6. Ensemencement .....</b>	<b>51</b>
<b>III.3.6.7. Déposition des disques .....</b>	<b>51</b>
<b>III.3.2.8. Incubation et Lecture .....</b>	<b>52</b>

## **CHAPITRE IV : Résultats et Discussion**

<b>IV.1. Rendement et propriétés organoleptiques : .....</b>	<b>53</b>
<b>IV.1.1. Calcule de rendement.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.1.2. Caractéristique organoleptique d'extrait chloroformique .....</b>	<b>53</b>
<b>IV.2. Les plaques CCM .....</b>	<b>53</b>

<b>IV.3. Activité biologique .....</b>	<b>57</b>
<b>IV.3.1. Résultats du test du pouvoir antibactérienne .....</b>	<b>57</b>
<b>IV.4. Discussion des résultats .....</b>	<b>58</b>
<b>IV.4.1. Le test 1.....</b>	<b>58</b>
<b>IV.4.1.2. Le test 2 .....</b>	<b>59</b>

**CONCLUSION GENERALE**

**RREFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre I

**Tableau I.1:** Les principaux composés phénoliques ..... 8

**Tableau I.2:** Classification botanique de la plante marrbium vulgare L ..... 15

## Chapitre II

**Tableau II.1 :** Les activités biologiques relatives à quelques lactones sesquiterpéniques . 30

## Chapitre III

**Tableau III.1:** les systèmes d'élution utilisés ..... 41

## Chapitre IV

**Tableau IV.1 :** Chromatogramme obtenu pour l'extrait chloroformique ..... 49

**Tableau IV.2 :** Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique ..... 52

**Tableau IV.3 :** la sensibilité des bactéries pour l'extrait chloroformique ..... 52

**Tableau IV.4 :** Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique . 53

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre I

<b>Figure I.1:</b> Les divers squelettes terpéniques .....	3
<b>Figure I.2:</b> Structure de quelques substances dans l'huiles essentielles .....	4
<b>Figure I.3:</b> Structures chimiques des alcaloïdes .....	5
<b>Figure. I.4:</b> Squelette de base des flavonoïdes .....	6
<b>Figure I.5:</b> la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes .....	6
<b>Figure I.6:</b> Structure de base de coumarines .....	7
<b>Figure I.7:</b> Les principaux composés des coumarines.....	7
<b>Figure I.8:</b> Structures chimiques de quelques composés phénoliques .....	9
<b>Figure I.9:</b> Exemples de structure de tanin hydrolysable.....	10
<b>Figure I.10:</b> Exemples de structure de tanins condensés .....	10
<b>Figure I.11:</b> Marrubium vulgare L .....	15

## Chapitre II

<b>Figure II.1:</b> structure de l' $\alpha$ -santonine .....	18
<b>Figure II.2:</b> structure de Freelingnite .....	23
<b>Figure II.3:</b> Exemples des élémanolides .....	24
<b>Figure II.4 :</b> structures des Ivambrine et Inulicine .....	25
<b>Figure II.5 :</b> structures des Santonine et Tanacetine .....	25
<b>Figure II.6 :</b> structures des Matricarine et Arctolide .....	26
<b>Figure II.7:</b> structures de Ambrosine .....	26
<b>Figure II.8 :</b> structures de Istaneuline .....	27
<b>Figure II.9 :</b> structures de Fukinolide .....	27

<b>Figure II.10</b> : Structure du groupement $\alpha$ -méthylène $\gamma$ -lactone .....	32
<b>Figure II.11</b> : Eupantariopierin et 2-oxoudartin .....	32
<b>Figure II.12</b> : plaque chromatographie.....	38
<b>Figure II.13</b> : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC.....	40

## Chapitre III

<b>Figure III.1</b> : Marrubium vulgare.....	43
<b>Figure III.2</b> : macération hydroalcoolique puis filtration sur Büchner .....	44
<b>Figure III.3</b> : Extraction liq-liq par l'éther de pétrole .....	45
<b>Figure III.4</b> : extraction liq-liq par chloroforme .....	46
<b>Figure III.5</b> : Evaporateur rotatif .....	47
<b>Figure III.6</b> : l'extrait chloroformique .....	47
<b>Figure III.7</b> : Analyse par CCM .....	50
<b>Figure III.8</b> : le révélateur chimique .....	50
<b>Figure III.9</b> : Des colonies d'E Coli .....	53
<b>Figure III.10</b> : Des colonies de <i>S. aureus</i> .....	53
<b>Figure III.11</b> : Des colonies de <i>P. aeruginosa</i> .....	54
<b>Figure III.12</b> : technique d'Ensemencement .....	56
<b>Figure III.13</b> : dépôt des disques .....	57

## Chapitre IV

<b>Figure IV.1</b> : résultat zones d'inhibition .....	62
<b>Figure IV.2</b> : zones d'inhibition .....	63

# LISTE DES SCHEMAS

## Chapitre II

<b>Schéma II.1:</b> principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques via un germacranolide .....	19
<b>Schéma II.2:</b> Représentation des différentes étapes de la biosynthèse de Farnesyl pyrophosphate .....	20
<b>Schéma II.3:</b> Les différentes étapes de la biogenèse Des lactones sesquiterpéniques ....	22
<b>Schéma II.4:</b> les différents dérivés des germacranolide .....	22
<b>Schéma II.5:</b> Synthèse de l'isabeline par Wender .....	29
<b>Schéma II.6 :</b> Synthèse de la zempoaline A et B par Bartel et Bohlmann .....	30

## Chapitre III

<b>Schéma III.1:</b> Schéma générale de l'étapes de l'extraction .....	48
--	----

# LISTE DES ABRIVIATION

**HE : huiles essentielles**

**A.F.NOR : Association Française de Normalisation**

**SQL : sesquiterpènes lactones**

**DCA : Dermatite de contact allergique**

**DA : Dermatite actinique chronique**

**CCM : Chromatographie sur couche mince**

**Rf : Rapport frontal**

**HPLC : Chromatographie liquide à haute performance**

**UV : Ultra-Violet**

**IR : Infra-Rouge**

**RMN : Résonance Magnétique Nucléaire**

**SM : Spectroscopie de Mass**

**DRX : Diffraction des Rayon X**

**liq-liq : liquide-liquide**

**ADN : Acide désoxyribonucléique**

**ARN : Acide ribonucléque**

**DMSO : Diméthylsulfoxyde**

**ATCC : American Type Culture Collection**

## INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante. Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc.

Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisés avec la plus grande prudence car elles peuvent avoir un risque de toxicité. *Marrubium vulgare* L., famille des Lamiacées communément connu par le nom Marriouth ou Marrube blanc, c'est une plante spontanée très répandue dans la région méditerranéenne. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle pour des fins thérapeutiques. Elle est utilisée pour le traitement de diabète [1], la dyspepsie et la perte d'appétit. Elle est utilisée pour le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites et de la coqueluche[2].

Ce présent travail comprend les Chapitres suivantes :

### **CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA PLANTE MARRUBIUM VULGARE L**

Présentation de quelques métabolites secondaires et description botanique de la plante étudiée 'Marrubium Vulgare L

### **CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, METHODES DE SEPARATION ET D'ANALYSE**

Ce chapitre consacré à la Présentation des généralités sur les sesquiterpènes lactones, leur différentes structures chimiques, leur biosynthèse..., *et* aussi les méthodes nécessaires à la séparation, purification et identification de structure de cette famille de substances naturelles

### **CHAPITRE III : : L'ETUDE EXPER EXPERIMENTALE**

Présente le travail dans laboratoire qui concerne l'extraction des sesquiterpènes lactones et On termine ce chapitre par un petit résumé rassemblant les activités biologiques et les protocoles utilisés pour l'évaluation.

### **CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION**

Enfin, Le dernier chapitre, décrira les résultats de l'extraction ainsi les résultats des activités biologiques étudiées.

CHAPITRE I

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

SUR LA PLANTE

MARRUBIUM VULGARE

L



## **I .1. Introduction**

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et la survie de l'humanité. Elles sont un patrimoine sacré et précieux et constituent une réponse de choix pour fournir à l'organisme, de façon naturelle, les substances nécessaires pour maintenir son équilibre vital.

## **I .2. Plantes Aromatiques et Médicinales**

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [3].

Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire.

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés[4]. Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs [5].

## **I .3. La phytothérapie**

La phytothérapie est l'utilisation des plantes (de l'ensemble des éléments de la plante) à des fins thérapeutiques. Ce terme vient du grec : « phytos » la plante et « therapiea » la thérapie. Il s'agit d'une des sciences médicales les plus anciennes.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme [6].

### **I.3. Présentation de quelques métabolites secondaires :**

Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types :

Les produits des métabolites primaires (essentiellement des saccharides) : Substances indésirables à la vie de la plante, qui se forment dans toutes les plantes vertes grâce à la photosynthèse.

Les produits des métabolites secondaires : processeurs résultant essentiellement de l'assimilation de l'azote, apparaissent souvent comme inutiles à la plante, mais utiles pour leurs effets thérapeutiques [7].

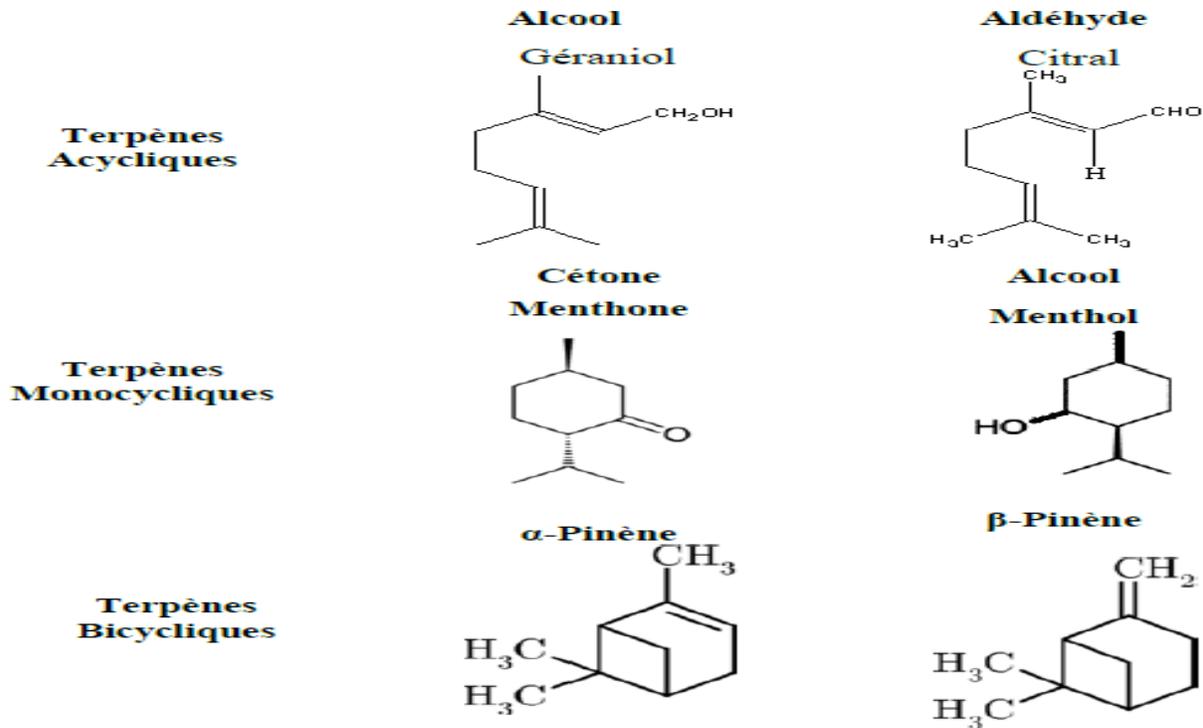
#### **I.3.1. Terpènes**

Les terpènes, ou isoprénoides, ou terpénoides sont l'une des classes les plus diverses de métabolites. Il a été répertorié plus de 30 000 composés dont la très grande majorité est spécifique du règne végétal et qui englobe les arômes et parfums, les antibiotiques, les hormones végétales et animales, les lipides des membranes... [8]

Les terpènes sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. La plupart des terpènes ont des structures cycliques. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ).

Les divers squelettes terpéniques (Figure I.1) sont classés par le nombre de chaînons isopréniques qui les composent :

- ❖ Monoterpènes  $C_{10}$
- ❖ Sesquiterpènes  $C_{15}$
- ❖ Diterpènes  $C_{20}$
- ❖ Triterpènes  $C_{30}$



**Figure I.1.** Les divers squelettes terpéniques [8]

Ainsi, les monoterpènes sont constitués par 10 atomes de carbone ou deux unités isopréniques. Ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles [9].

Sur le plan économique et santé humaine, l'importance des terpènes des plantes ne cesse de croître [10]. La culture du matériel végétal spécifiquement pour sa teneur en terpènes est maintenant une activité économique majeure [11]. D'autre part, Fraser et coll. rapportent qu'un nombre croissant de terpènes ont une activité antibactérienne et des propriétés anticancéreuses. La toxicité des monoterpènes et des caroténoïdes notamment est relativement faible et leur biodisponibilité dans le régime alimentaire est élevée, ce qui rend ces composés intéressants comme agents thérapeutiques potentiels.

### I.3.2. Les huiles essentielles

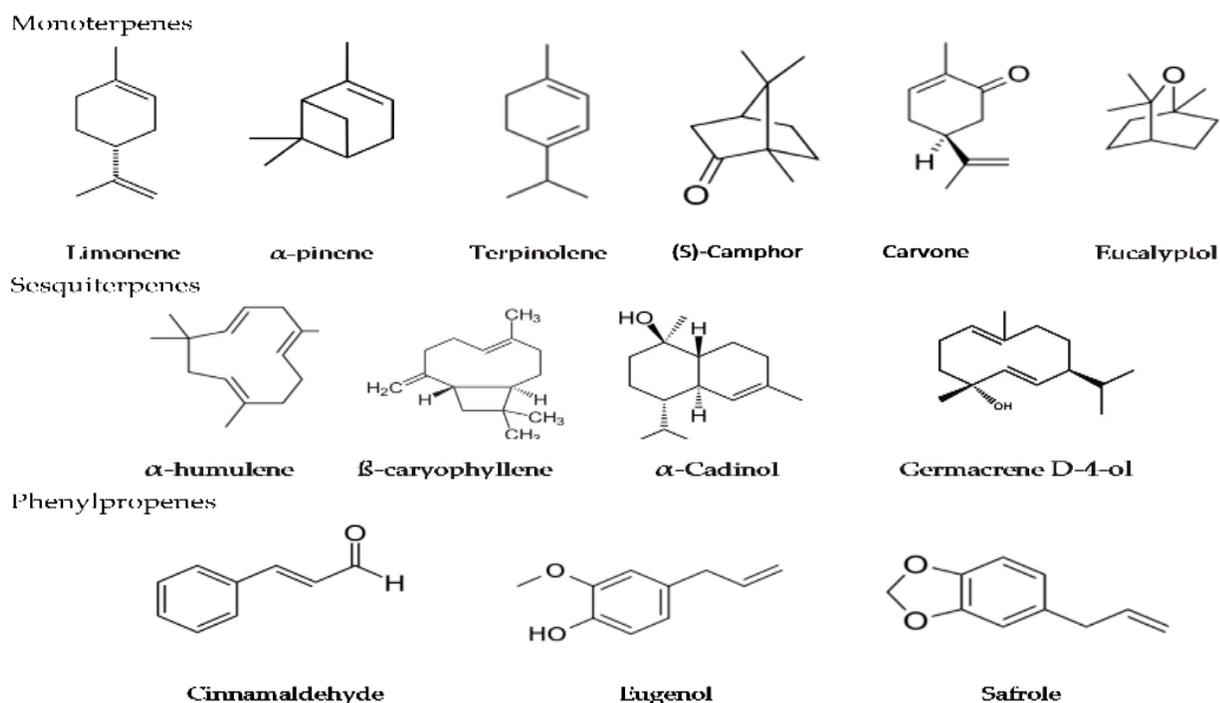
Les HE sont des liquides volatiles, réfringents, optiquement actifs, voisins des huiles, d'odeur tout à fait caractéristique. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire [12].

Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes. Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes) [13].

A son tour, la norme A.F.NOR NF T 57-006 a donné la définition suivante d'un HE :

« produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de Citrus, soit par la distillation sèche » [14].

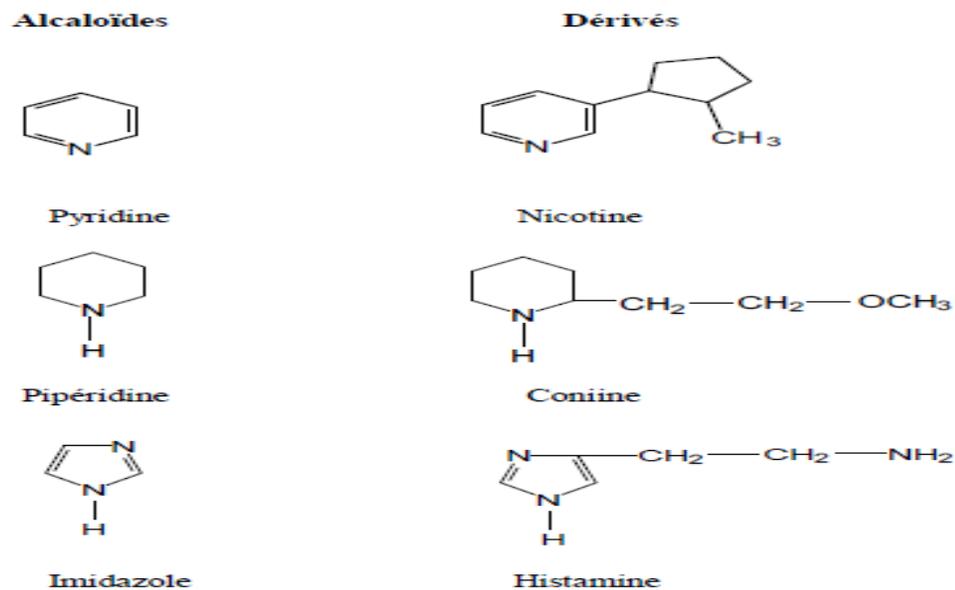
Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés médicinales, susceptibles de répondre à tous les besoins des êtres humaines. Elles sont antiseptiques, antibactériennes, anti-infectieuses et cicatrisantes [16]. certaines possèdent ainsi des vertus anti-inflammatoires, tandis que d'autres sont antispasmodique diurétique ou expectorantes [15]. Elles peuvent souvent remplacer les antibiotiques, et sont extrêmement efficaces pour combattre certaines infections pulmonaires, intestinales, cutanées ou urinaires (figure1.2)



**Figure I.2.** Structure de quelques substances dans l'huiles essentielles [13]

### I.3.3. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des composés azotés complexes, de nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique [6]. Les alcaloïdes sont des hétérocycliques à caractère alcalin contenus essentiellement dans les plantes, (figure I.3) [14].



**Figure I.3.** Structures chimiques des alcaloïdes [14]

### I.3.4. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-Phényl-Chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides [17].

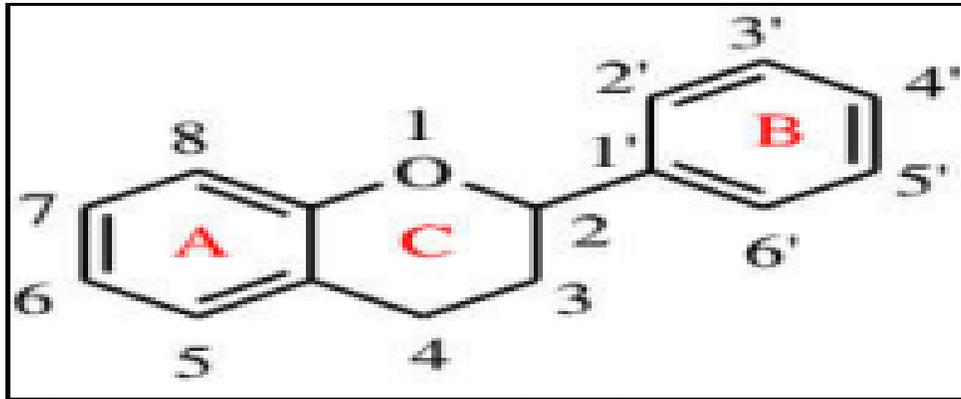


Figure I.4. Squelette de base des flavonoïdes [18].

Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune, suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate

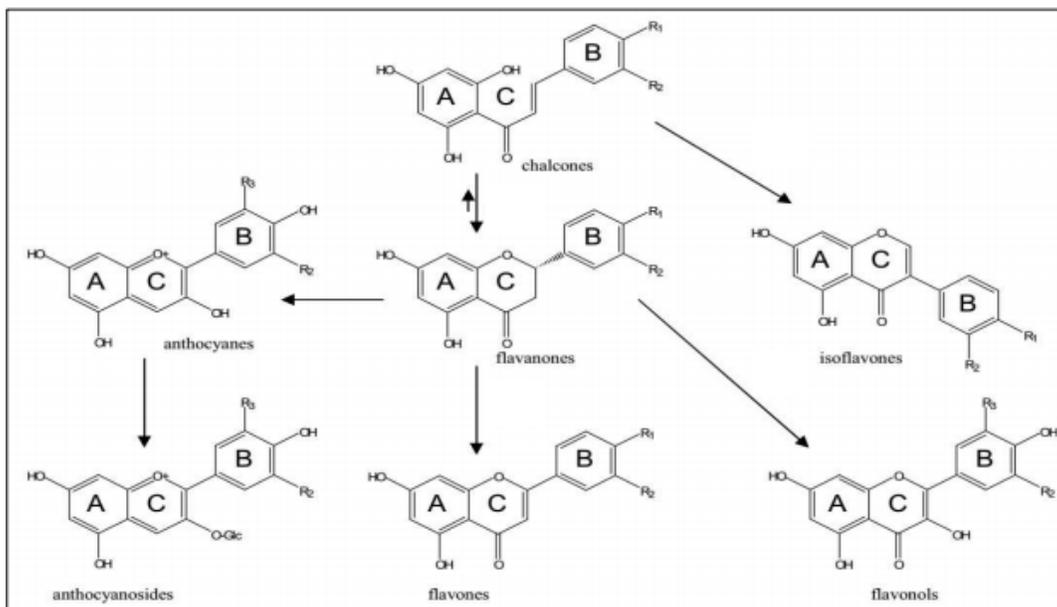
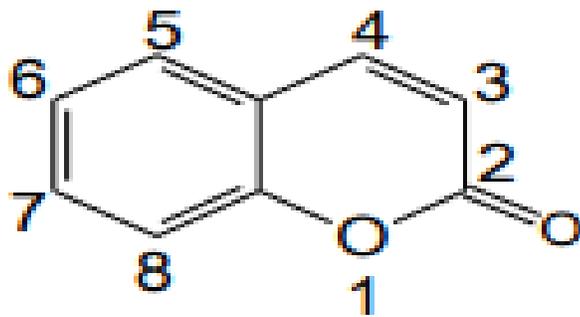


Figure I.5. Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes [19]

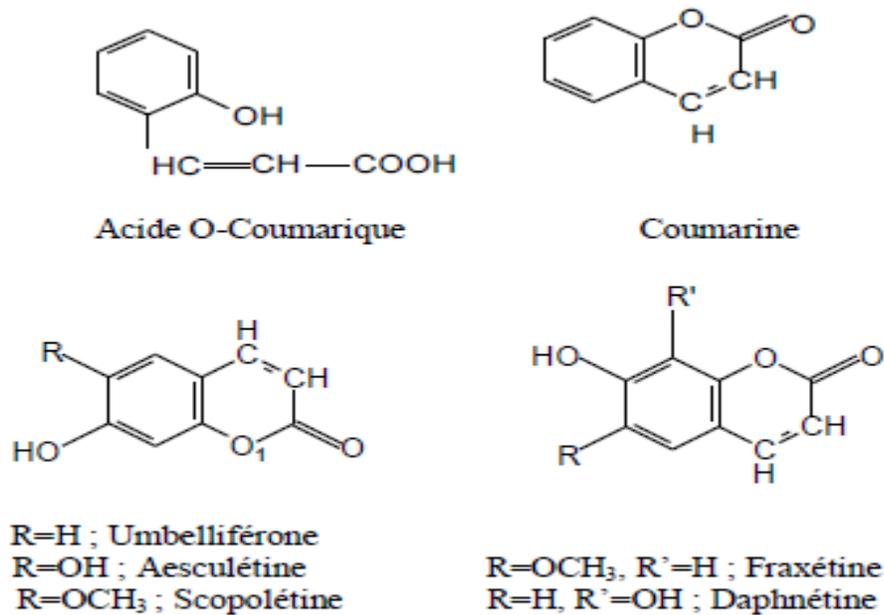
### I.3.5. Les coumarines :

Les coumarines sont des composés phénoliques ayant un squelette de base en C6-C3, Généralement hydroxylés en position 7, en 6, 7 et en 6, 7, 8.



**Figure I.6 :** Structure de base de coumarine [20]

Les coumarines sont des composés aromatiques dérivant de l'acide O-hydroxy-Z-cinnamique, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide ortho-coumarique [19].(figure I.6).



**Figure I.6.** Les principaux composés des coumarines [20]

### I.3.6. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside (figure I.7) [21].

Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus, les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthones, les coumarines et d'autres classes existent en nombre considérable (Tableau I.1.) [22].

**Tableau I.1:** Les principaux composés phénoliques [21].

N°de Carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C <sub>6</sub>	Phénol simple	- Catéchol (1)
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénoliques	- Acide Salicylique (2)
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénones	- 3-acetyl-6-méthoxybenzaldéhyde (3)
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	- Acide hydroxycinnamique	- Acide caféique (4)
		- Phénylpropènes	- Eugénol (5)
		- Coumarines	- Umbelliférone (6)
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	- Juglone (7)

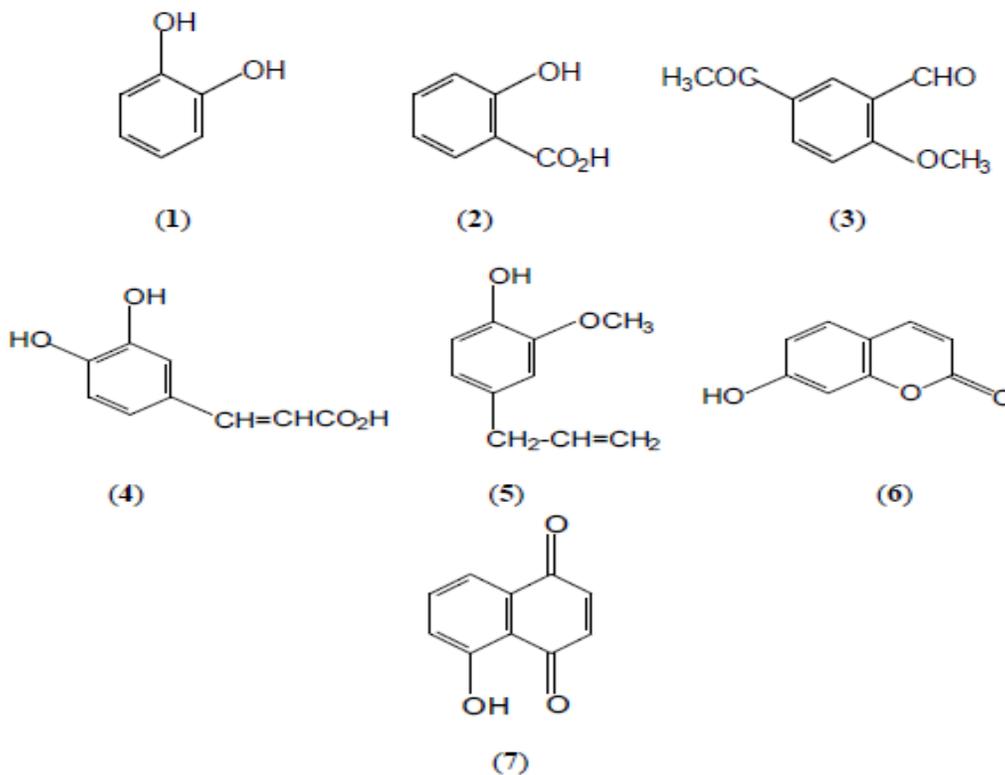


Figure I.7. Structures chimiques de quelques composés phénoliques [22].

### I.3.7. Les tanins

Ce sont des composés phénoliques complexes d'origine végétale, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000. En plus des réactions classiques des phénols, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et de rendre la peau imputrescible en se fixant sur les protéines [23].

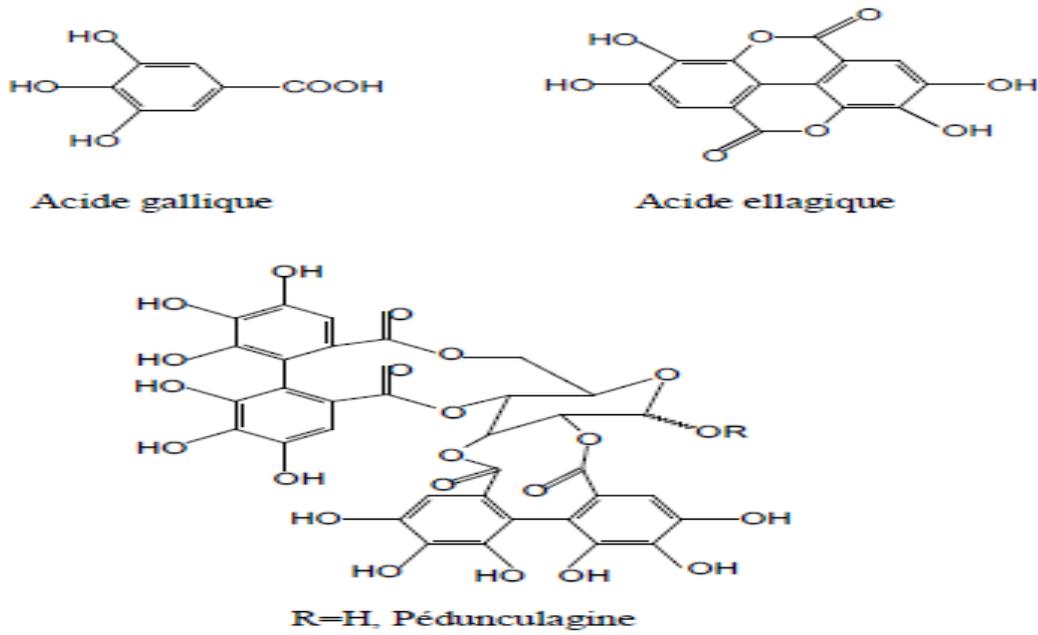
Ces substances, de composition chimique variable, présentent un caractère commun :

Leur capacité de coaguler les albumines, les métaux lourds et les alcaloïdes. Elles sont hydrosolubles. - Leur intérêt médicinal réside essentiellement dans leur caractère astringent. - Leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, en créant ainsi une couche de coagulation isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur, d'arrêter les petits saignements [12].

Chez les végétaux supérieurs, il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biosynthétique :

**a- Les tanins hydrolysables :**

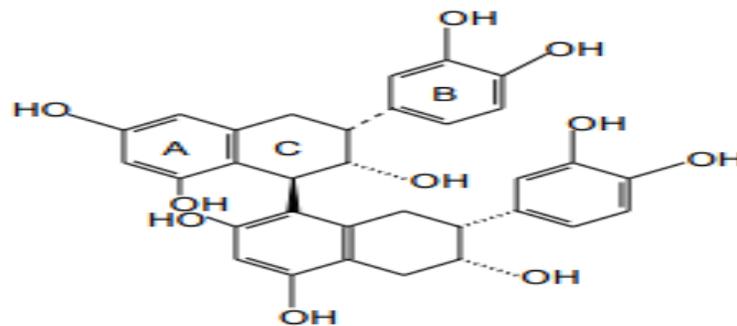
Donnent par hydrolyse un ose et un nombre variable de molécules d'acide phénolique, d'acide gallique ou d'acide ellagique (figure I.8).



**Figure I.8.** Exemples de structure de tanin hydrolysable [22]

**b- Les tanins condensés ou proanthocyanidols :**

Les tanins condensés sont des polymères constitués par des unités de flavan-3-ols (catéchol, épicatechol, ..... ) liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (figure I.9) [15].



**Figure I. 9.** Exemples de structure de tanins condensés[24]

### **I.3.8. Les saponines**

Les saponines sont très communes dans les plantes médicinales. Du point de vue chimique, elles se caractérisent également par un radical glucidique (glucose, galactose) joint à un radical aglycone [12].

Les saponosides sont une classe d'hétérosides très répandue chez les plantes et les animaux marins. Ce sont des glycosides stéroïdiques ou triterpéniques qui ont la propriété de former des solutions moussantes en présence d'eau et de précipiter le cholestérol [25].

### **I.3.9. Les mucilages**

Les mucilages sont des polymères complexes de fucose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Ce sont des substances que l'on trouve comme constituant important des algues pluricellulaires. Chez les végétaux supérieurs, les mucilages se trouvent essentiellement dans la sève. On ignore l'utilité exacte des mucilages pour les plantes. Diverses hypothèses font état que les mucilages pourraient être des cicatrisants.

On trouve des mucilages chez pratiquement toutes les plantes, mais certaines en sont plus riches que d'autres. On trouve bien entendu des mucilages chez les algues (fuciales). Chez les plantes supérieures, diverses scrofulariacées, des malvales, des violales, divers lauriers, les tilleuls contiennent des quantités significatives de mucilages.

### **I.3.10. Les vitamines**

Les vitamines sont des substances indispensables pour le bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, le corps humain ne pouvant les synthétiser lui-même, il faut les lui apporter dans l'alimentation en mangeant notamment des végétaux qui en contiennent souvent une quantité considérable. La teneur en vitamines varie toutefois fortement d'une plante à l'autre.[26].

### **I.3.11. Les anthraquinones**

Les anthraquinones sont des composés aromatiques qui provoquent des contractions des parois du gros intestin et ont ainsi une action extrêmement laxative [26] . Ils stimulent les

évacuations environ dix heures après la prise. Elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal.

### **I.3.12. Les minéraux**

Des sels minéraux et oligo-éléments. En petit, même très petite quantité, ce sont des éléments indispensables de construction [27] .

De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux, c'est-à-dire des substances inorganiques qui nécessaires à la construction des tissus protecteurs, à la synthèse des enzymes et au bon fonctionnement du système nerveux.

### **I.3.13. Les glucosides**

Les glucosides sont des composants organiques. Comme ils sont souvent des actions différents, ils sont répartis en divers sous-groupes dont le plus important est représenté par les glucosides cardiotoniques utilisés pour augmenter l'activité cardiaque lorsqu'elle est insuffisante. Ils ont en générale aussi les propriétés diurétiques ce qui entraine une diminution des liquides dans les tissus et fait ainsi baisser la pression artérielle [26] .

### **I.3.14. Les substances amères**

Les substances amères forment un groupe très diversifié de composants dont le point commun est l'amertume de leur gout. Cette amertume stimule les sécrétions des glandes salivaires des organes digestifs. Ces sécrétions augmentent l'appétit et améliorent la digestion. Avec une meilleure digestion, et l'absorption des éléments nutritifs adaptés, le corps est mieux nourri et entretenu [26].

## **I.4. Etude botanique de la plante étudiée**

### **I.4.1. Présentation de la plante**

#### **I.4.1.1. Présentation de la Famille des Lamiacées**

La famille des Lamiacées est composée de près de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, à tige quadrangulaire et à inflorescences verticillées. Les feuilles sont généralement opposées ou verticillées, simples ou très rarement pennatiséquées ; il n'y a pas de stipule. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes, les inflorescences sont en cymes bipares

puis unipares (Par manque de place). Le calice est synsépale, typiquement 5-mère, parfois bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle est sympétale et typiquement bilabiée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes [28,29] .

### **I.4.1.2. Distribution :**

La distribution géographique des lamiacées est cosmopolite. Les lamiacées sont rencontrées sous tous les climats, à toutes les altitudes. Certains des 200 genres que compte la famille sont quasiment cosmopolites, d'autres ont une distribution plus restreinte. Rare dans le milieu forestier tropical, les Lamiacées se concentrent dans la région méditerranéenne [24].

Les lamiacées comprennent environ 2 500 espèces dont l'aire de disposition est extrêmement étendue, elles sont particulièrement abondantes dans la région méditerranéenne [30].

Les lamiacées sont surtout des plantes méditerranéennes qui, au Sahara ne se rencontrent guère que dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, sauf les trois espèces *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptica* et *Teucrium polium* qui sont plus largement répandues et en particulier, les deux premières espèces [31].

### **I.4.1.3. Intérêt économique :**

La famille renferme de nombreuses espèces économiquement importantes soit par leurs huiles essentielles, soit pour leur usage condimentaire, elles appartiennent aux genres *Mentha* (la Menthe), *Lavandula* (la Lavande), *Marrubium* (le Marrube), *Nepeta* (L'Herbe aux chats), *Ocimum* (le Basilic), *Origanum* (l'Origan), *Rosmarinus* (le Romarin), *Salvia* (la Sauge), *Satureja* (la Sarriette) et *Thymus* (le Thym). Les tubercules de quelques espèces de *Stachys* sont comestibles. *Tectona* (le Tek) fournit un bois d'oeuvre important. De nombreux genres contiennent des espèces ornementales : on peut citer parmi eux *Ajuga*, *Callicarpa*, *Clerodendrum*, *Monarda*, *Salvia*, *Scutellaire* et *Vitex* [13].

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridoïdes glycosylés. Le genre *Phlomis* comptant près de 100

espèces est particulièrement riche en flavonoïdes, phényléthanoides, phenylpropanoides et en iridoïdes glycosylés. Le genre *Salvia*, comprenant près de 900 espèces majoritairement riches en diterpénoides et le genre *Marrubium* avec environ 30 espèces réparties dans un grand nombre de pays du globe [21].

### **I.4.2. Présentation du genre *Marrubium***

#### **I.4.2.1. Aspect botanique**

Le genre *Marrubium* comporte quelque 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine [32].

Le genre *Marrubium* est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse. C'est un Arbuste à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aiguës. Les fleurs sont blanches. en Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium deserti* [33].

#### **I.4.2.2. Aspect phytochimique**

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* [24]. Au regard des données bibliographiques ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les tri-terpènes et les tannins.

### **I.4.3. Présentation de l'espèce : *Marrubium vulgare***

Le marrube blanc (*Marrubium vulgare*), famille des Lamiacées, est une plante herbacée vivace, spontanée très répandue dans la région méditerranéenne (figure I.10)

En Algérie, il existe deux espèces : *Marrubium vulgare* appelé marrube blanc, répandu au nord du pays et *Marrubium deserti* ou marrube du désert dégageant une forte odeur, musquée, très présente au Sahara et dans les hautes plaines steppiques.

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth (30), Merrîwt au Maroc (22.), Marroubia en Tunisie

En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubbi



**Figure I.10:** Marrubium vulgare

**Tableau I.2:** Classification botanique de la plante marrubium vulgare L

Règne :	Végétale
Sous règne :	Plantes vasculaire
Embranchement :	Spermatophytes
Division :	Magnoliophytes
Classe :	Magnolipsides
Sous classe :	Astérides
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Marrubium</i>
Espèce :	<i>vulgare</i>
<i>Nom binomial :</i>	<i>Marrubium vulgare</i>

#### **I.4.3.2. Description morphologique :**

Le marrube blanc est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 80 cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords sont blanchâtres et duveteux sur la face inférieure. Les fleurs petites, blanches, avec un calice à dents crochues sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles. le fruit est un tétra-akène. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du gout et de l'odorat) et amère [34].

#### **I.4.3.3. Répartition géographique :**

Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande [35].

Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne [36].

#### **I.4.3.4. Utilisation traditionnelle :**

Le marrube blanc est une prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de la coqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique [37]. Le *Marrubium vulgare* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie [38].

#### **I.4.3.5. Toxicité :**

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il ya une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie [34].

# CHAPITRE II

## GENERALITES SUR LES SESQUITERPENES LACTONES, METHODES DE SEPARATION ET D'ANALYSE

### **II.1. Introduction**

Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe numériquement important des substances (environs 5000 structures enregistrées) [39].

Les lactones sesquiterpéniques ont une distribution botanique assez sporadique, présentes chez les angiospermes (Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae) et très majoritairement chez les compositae. Chez ces dernières, les lactones sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Elles sont également assez souvent présentes dans les racines [4].

Dans cette partie, nous représenterons quelques généralités sur les lactones sesquiterpéniques, particulièrement les mécanismes de biogenèse et les propriétés biologiques

### **II.2. Généralités sur les lactones sesquiterpènes**

Les lactones sesquiterpéniques (SQL) constituent un groupe large et très diversifié de composés phytochimiques biologiquement actifs. Dans les anciens traités de matière médicale, elles étaient appelées « principes amers ».

Les différences dans les quantités et les structures chimiques des lactones sesquiterpéniques dans plusieurs genres et espèces de cette famille ont fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques, notamment les études pharmacologiques et chimiotaxonomiques [40,41].

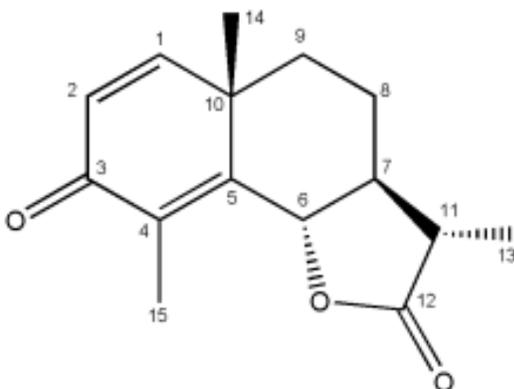
### **II.3. Caractéristiques des lactones sesquiterpènes**

Les lactones sesquiterpéniques représentent une classe très intéressante de terpénoïdes, elles sont formées à partir de la condensation de trois unités isoprènes, tête-queue-tête, pour produire leur squelette de base à 15 atomes de carbone ; ce dernier subissant des transformations ultérieures : cyclisation et oxydation donnant lieu à une cis ou trans-fusion lactonique, d'où l'ajout du suffixe « olide » au nom du squelette sesquiterpénique indiquant ainsi le caractère lactonique.

Les squelettes sesquiterpéniques  $C_{15}H_{24}$  sont très variés, particulièrement lorsqu'ils sont fonctionnalisés. Des structures acycliques, cycliques, mono, bi et tricycliques ont été caractérisées, les monocycliques sont les plus fréquents. Mais ceux dérivant du squelette de germacrane sont les plus connus lorsque le sesquiterpène porte une fonction lactone, environ 5 000 structures sont caractérisées. [41]

## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse

L'isolation et l'établissement de leurs structures remontent à plus d'un siècle. En effet, l' $\alpha$ -santonine a été isolé pour la première fois en 1930 [39] (figure II.1).



**Figure II.1:** structure de l' $\alpha$ -santonine.

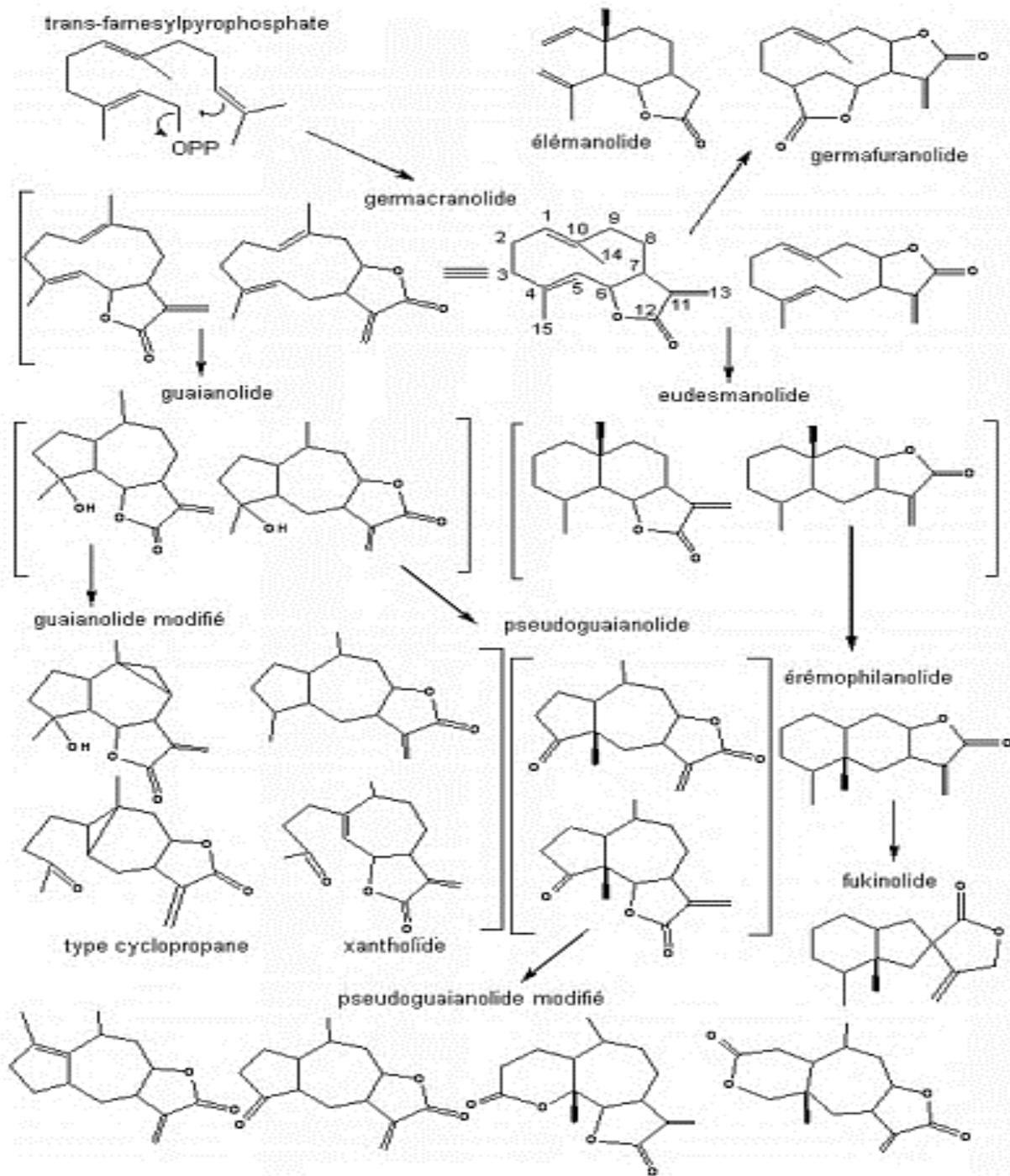
### II.4. Structures des lactones sesquiterpéniques

Les structures des lactones sesquiterpéniques sont variées mais, dérivent toutes du produit de cyclisation cyclodécadiénylique du 2E, 6E, farnesylpyrophosphate. Bien que les preuves expérimentales soient rares, il est admis que les principaux squelettes sesquiterpéniques se forment via les germacranolides eux-mêmes issus de la cyclisation du cation cyclodécadiénylique. Logiquement, la structure du produit de cyclisation dépend de la conformation initiale adoptée par le macrocycle et la position des doubles liaisons qui permettent des cyclisations intramoléculaires variées. En fait, l'enzyme impliqué dans cette réaction doit en principe conditionner la stéréospécificité du processus [15]. (schéma n°1)

Les variations structurales secondaires sont nombreuses et portent :

- ❖ Sur le cycle lactonique, en général de type  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone et dans tous les cas (sauf chez les lactones issues des briophytes) le proton en C7 est  $\alpha$  autrement dit la liaison C7-C11 est  $\beta$ . elle peut être cis 12, 6 ; cis 12, 8 ; trans 12, 6 ou trans 12,8 olide.
- ❖ Sur les groupes méthyles (C14 et C15) souvent fonctionnalisés (alcool, acide carboxylique, époxyde, ester...). - sur les insaturations qui peuvent être réduites ou oxydées (époxydes, hydroxyles et fréquemment esters).

**CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES,  
Méthodes De Séparation Et D'analyse**

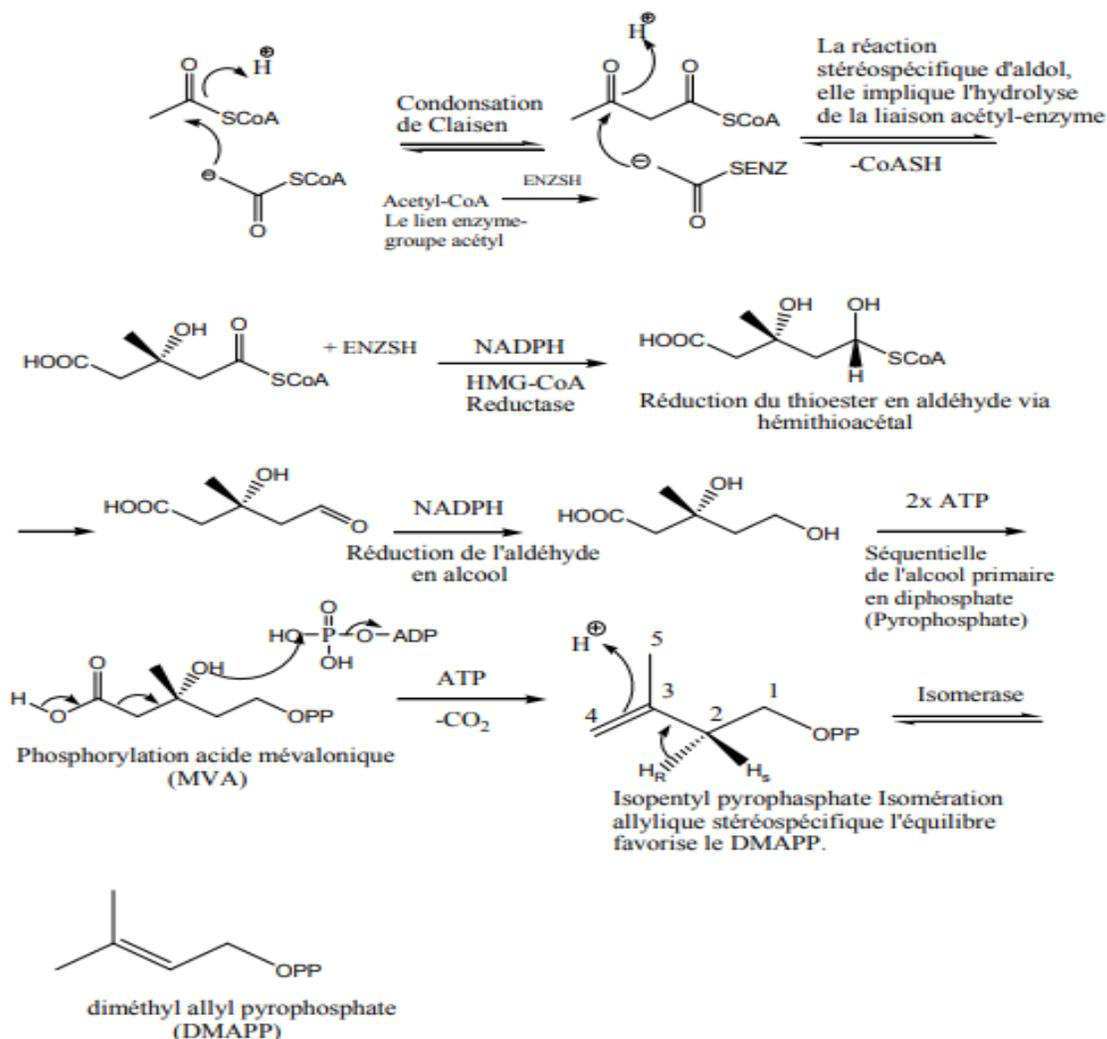


**Schéma II.1:** principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques via un germacranolide[4]

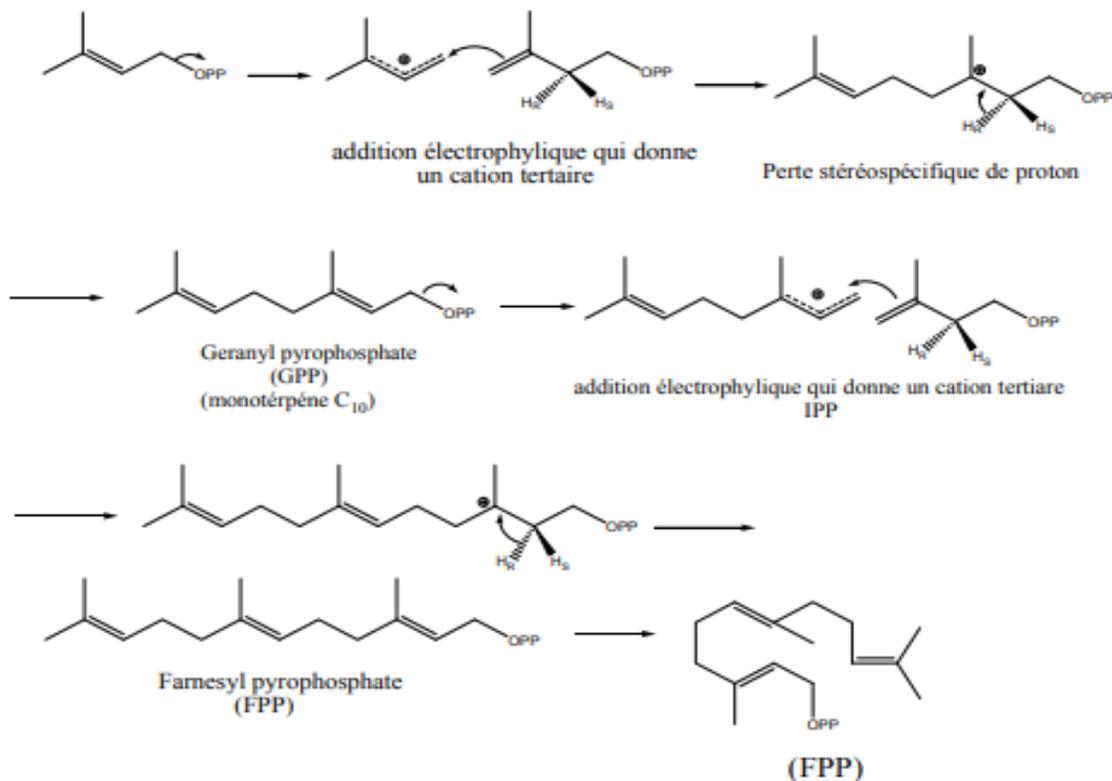
**II.5. Biogenèse des lactones sesquiterpènes**

La première hypothèse sur la biogenèse des composés terpéniques à été formulée par RUZIKA [42,43], puis plus tard par HENDRICKSON 1959, qui avait envisagé toutes les étapes de la biosynthèse possibles à partir des unités acétate, desquelles se forme le mévalonate par condensation des trois unités qui donnent l'isopenténylpyrophosphate par décarboxylation. [44]

Les combinaisons des trois unités de diméthylallylpyrophosphate dans l'ordre « tête- queue » forme le farnesylpyrophosphate d'après la stéréochimie des trois doubles liaisons, le farnésol peut exister sous forme de quatre isomères géométriques dans les lactones monocycliques sesquiterpéniques. « schémaII.2 »



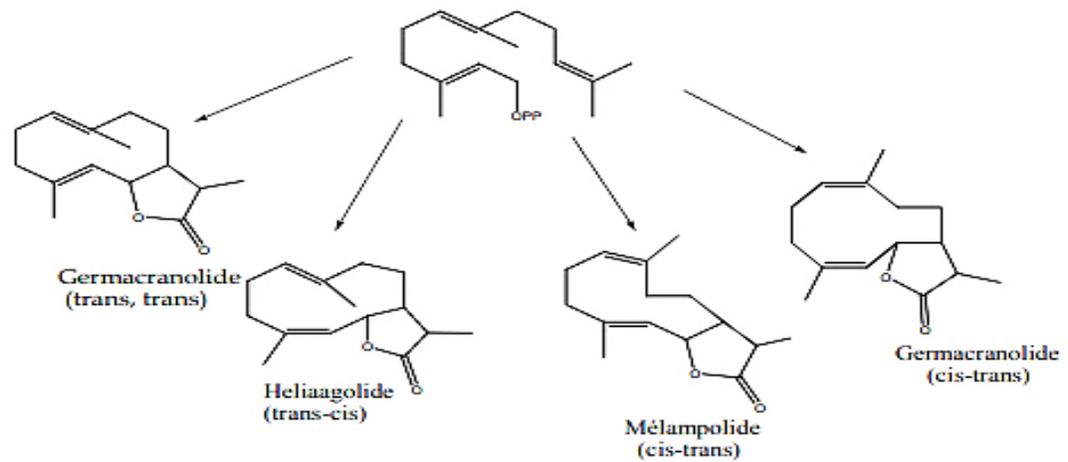
## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse



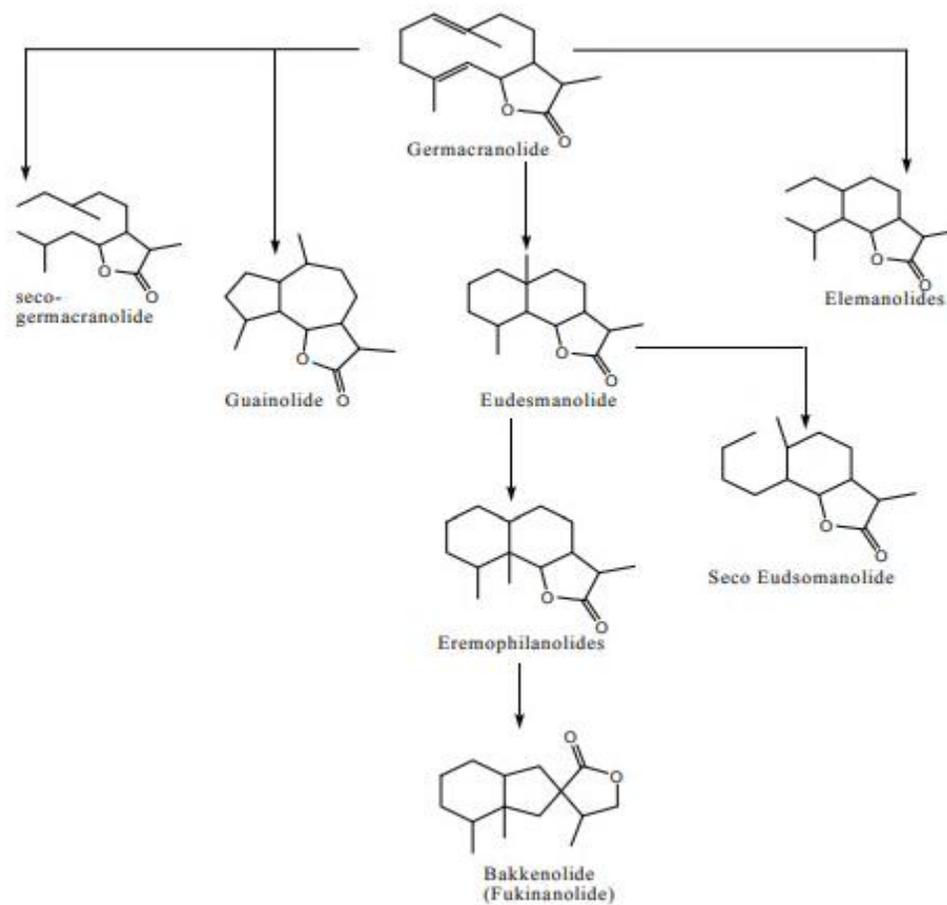
**Schéma II.2:** Représentation des différentes étapes de la biosynthèse de Farnesyl pyrophosphate [45]

Ces isomères, farnesylpyrophosphate, forment à la base le germacra-1(10), 4-diène-6, 12-olide dont la structure peut être déduite de l'isomère géométrique du farnesylpyrophosphate correspondant après cyclisation, oxydation d'un groupe méthyle de l'isopropyle, oxydation de l'atome de carbone 6 et fermeture sur l'oxygène de la fonction hydroxyle. C'est de l'ensemble de ces réactions, impliquant des cyclisations du farnesyl pyrophosphate que proviennent un grand nombre de lactones sesquiterpéniques caractérisées par le groupe lactonique en C (6) et C (8). « schéma.II.4 »

**CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES,  
Méthodes De Séparation Et D'analyse**



**Schéma II.3:** Les différentes étapes de la biogenèse des lactones sesquiterpéniques[45]



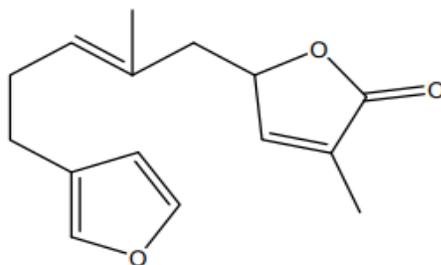
**Schéma II.4:** les différents dérivés des germacranolide[45]

## **II.6. Classification**

Selon les squelettes de carbone Les lactones sesquiterpéniques qui ont pour précurseurs le farnesyl pyrophosphate se classent selon le nombre de cycles du squelette carboné.

### **II.6.1. Les lactones sesquiterpéniques acycliques**

Le squelette carboné de ce type de lactone se forme probablement par décomposition de liaison C (2)- C (3) du squelette germacrane monocyclique à savoir le secogermecranolide-2,3. On peut citer en exemple la freelingnite [46]. Exemple : (figure II.2) :



**Figure II.2:** structure de Freelingnite[46]

### **II.6.2. Les lactones sesquiterpéniques monocycliques**

#### **II.6.2.1. Les germacranolides**

Les germacranolides ont comme squelette de base un cycle à dix atomes de carbone. La plupart d'entre eux contient deux doubles liaisons entre C (1) et C (10) et se distinguent les uns des autres par la stéréochimie de ces doubles liaisons.[46]

#### **II.6.2.2. Les héliangolides**

Ce sont les germacranolides avec une double liaison trans (E) (C (1) et C (10) ) et autre (Z) (C(4) et C(5))

### **II.6.2.3. Les mélampolides**

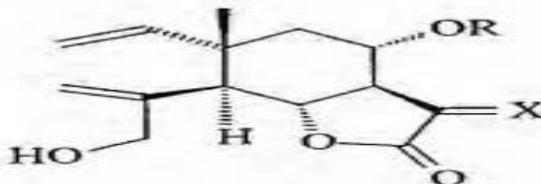
Ce sont les germacranolides avec une géométrie des doubles liaisons opposées à celles des héliangolides. A côté de ces types de germacranolides sont décrit d'autres groupes avec d'autres positions des doubles liaisons [46].

### **II.6.2.4. Les seco-eudesmanolides-1,10**

Ils sont obtenus par la décomposition de sesquiterpènes à squelette carboné bicyclique et en sont considérés comme dérivés secondaires.

### **II.6.2.5. Les élémanolides**

Ce sont des seco-eudesmanolides-2,3, ils se forment par un réarrangement de COPE des germacrane-1(10), 4-diénoles. Plus de 30 lactones natives de ce type sont décrites. On peut élucider : la melitensine 13 du *Centaurea melitensis* et *Centaurea aspera* la 11,13-dihydromélintensine 14 du *Centaurea aspera*[47-48]

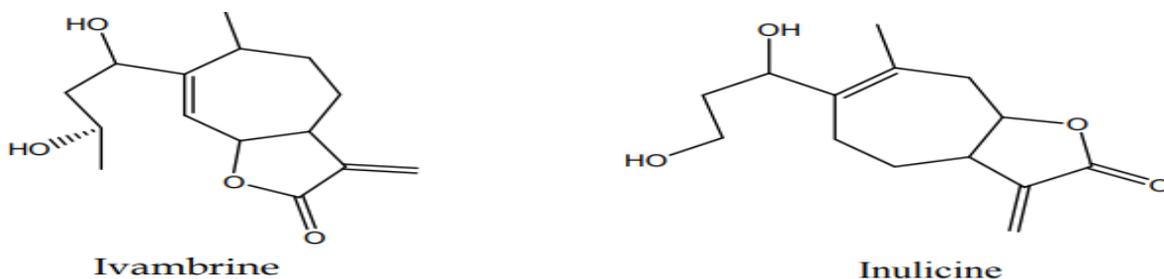


**Figure II.3:** Exemples des élémanolides [43]

### **II.6.2.6. Les xanthanolides**

Ils sont considérés comme des seco-guaianolides-4,5, plus de 20 produits natifs de ce type sont décrits dans la littérature. On peut encore citer les secoguaianolides-4,5 et les secopseudoguaianolides -4,5 dont plus de 10 produits natifs ont été isolés. L'ivambrine et l'inulicine illustrent cette famille de composés.

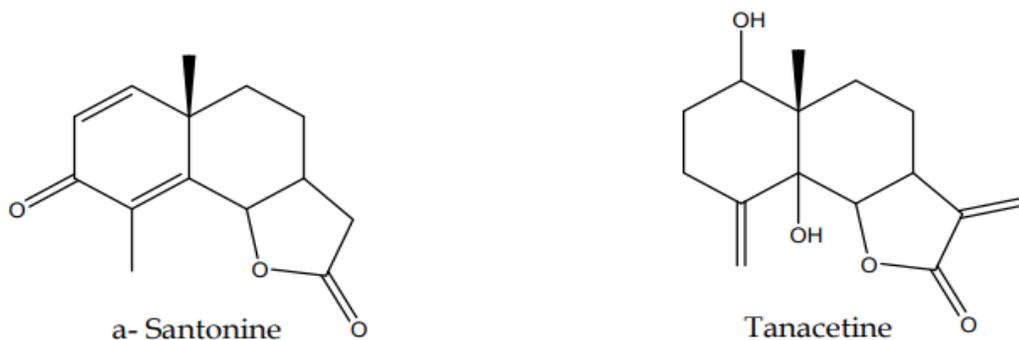
Exemple :



**Figure II.4** : structures des Ivambrine et Inulicine[47]

#### II.6.2.7. Les eudesmanolides

Appelés aussi selinanolides, ce groupe contient plus de 150 lactones natives et est formé à la base du squelette diméthyl-1,7-isopropyl-4 bicyclo [0, 4, 4] décane qui se produit du squelette germacrane par cyclisation trans-annulaire entre C(5) et C(10) en formant deux cycles hexagonaux .Deux des lactones sesquiterpéniques les plus connues de ce type sont présentées dans la figure (Figure II.5).



**Figure II.5** : structures des Santonine et Tanacetine[48]

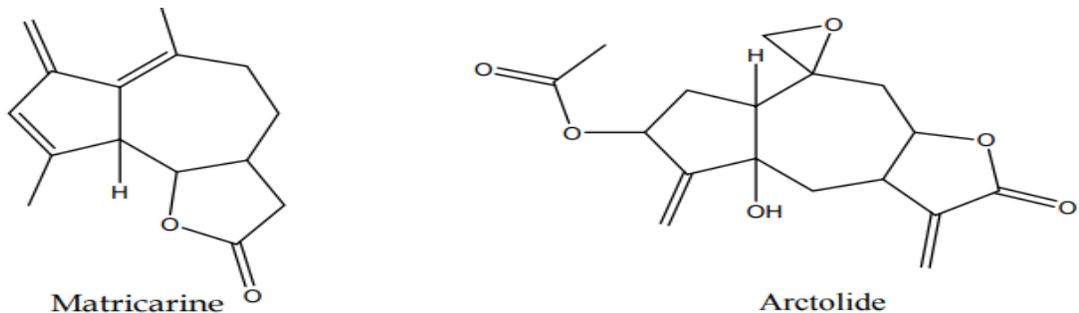
#### II.6.2.8. Les Guaianolides

Leur squelette de base est formé du diméthyl 2-8 isopropyl-5 bicyclo[0,3,5] décane qui se déduit du squelette germacrane par cyclisation trans-annulaire entre C(5) et C(1) en

## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse

---

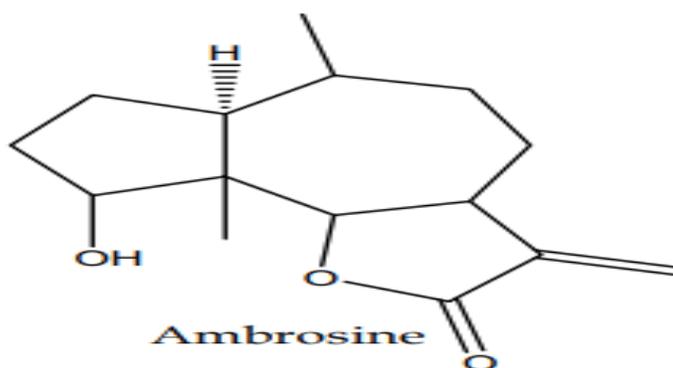
formant un cycle pentagonal et un autre heptagonal. La plupart des produits de ce type donnent par déshydrogénation des dérivés de l'azulène. Cent cinquante lactones natives de ce type ont été isolées. Deux d'entre elles sont représentées ci-après :



**Figure II.6 :** structures des Matricarine et Arctolide[47]

### II.6.2.9. Les pseudo-guaianolides

Ils se forment à partir du squelette guaiane après migration du groupe méthyle de la position C (4) à la position C (5). Exemple (Figure II.7)

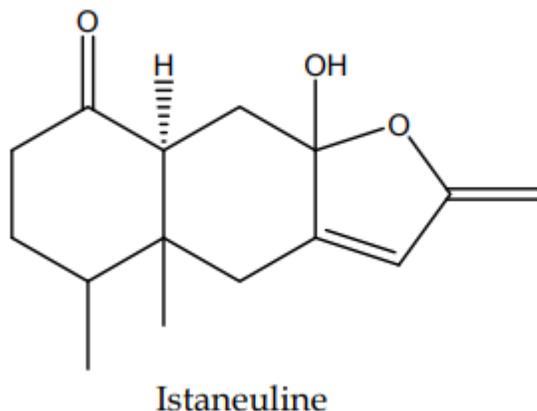


**Figure II.7:** structures de Ambrosine[47]

### II.6.2.10. Les eremofilanolides

Le squelette d'eremofilane se forme à partir du squelette eudesmane par migration du groupe méthyle de C (10), C.(5) Plus de 25 lactones de ce type sont décrites. Tous les eremofilanolides décrits jusqu'à présent ont leur groupe lactonique fermé en C.(8)

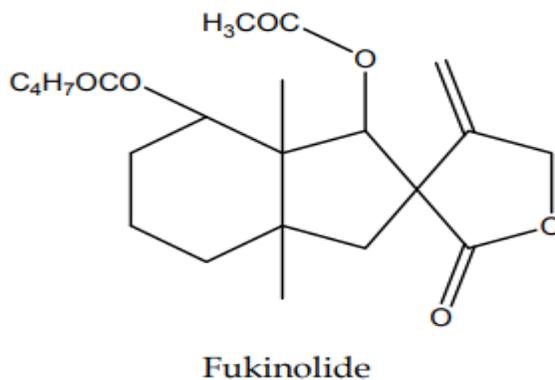
Exemple :



**Figure II.8** : structures de Istaneuline[47]

### II.6.2.11. les bakkenolides

Appelés aussi fukinanolides, ce groupe se début par le réarrangement de la liaison C (9), C(8) du squelette d'eremofilanolides. Plus de 10 produits natifs de ce type été isolés. Le fukinolide en est l'un deux.



**Figure II.9** : structures de Fukinolide[47]

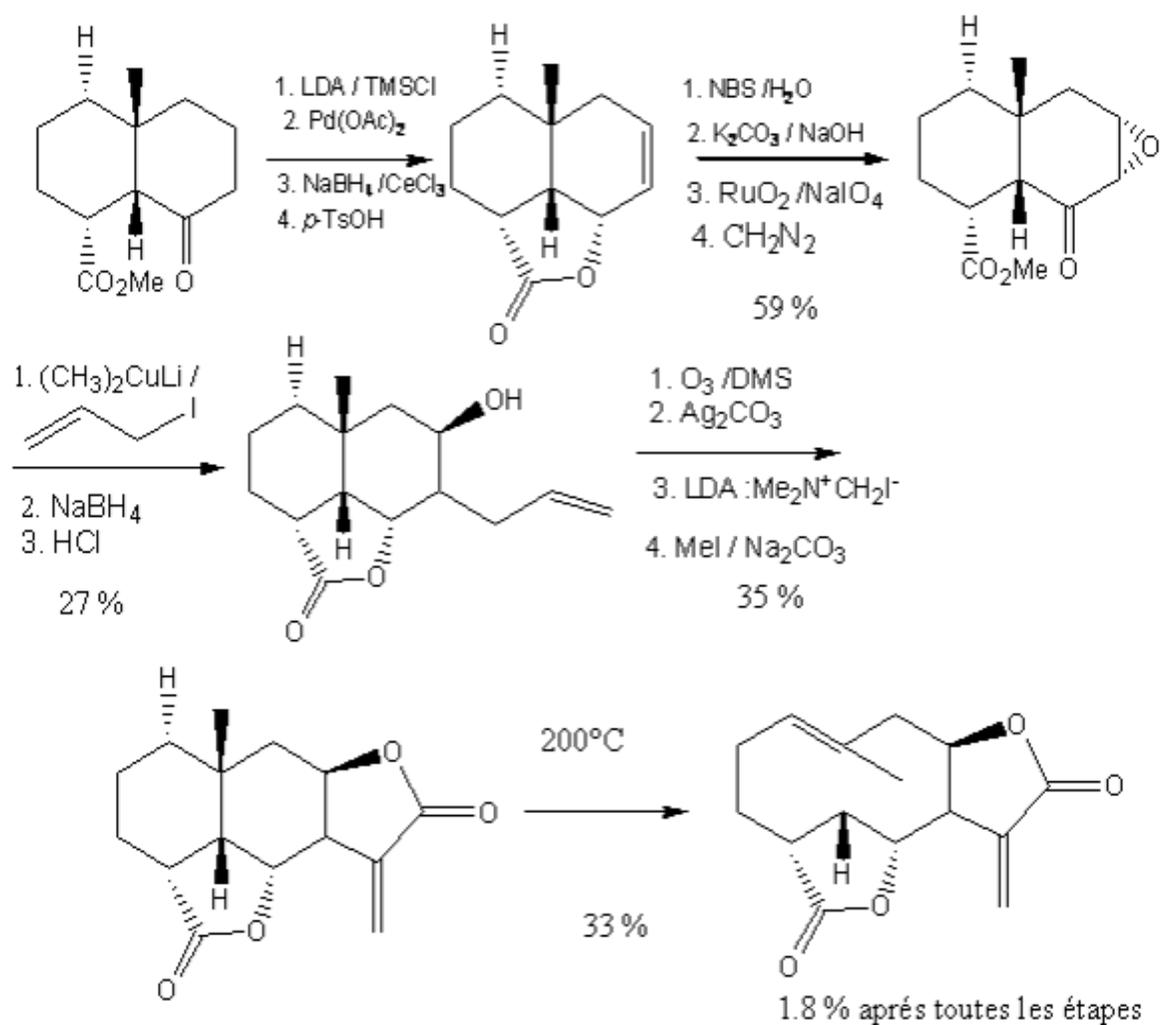
### **II.6.3. Sesquiterpène lactones polycycliques**

Les sesquiterpènes lactones tricycliques sont connues, il existe de même celles avec un plus grand nombre de cycles carbonés.

### **II.7. Synthèse totale des sesquiterpènes lactones**

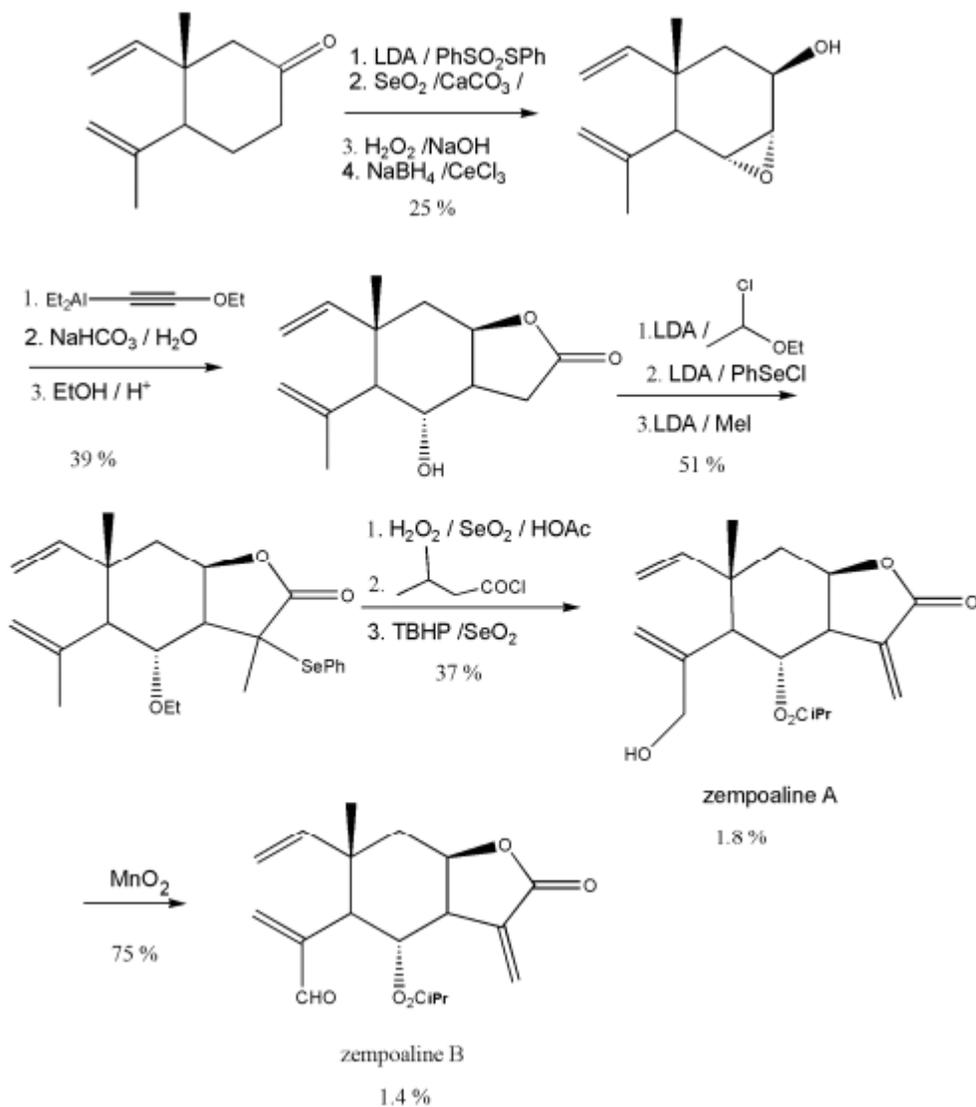
Les sesquiterpènes lactones ont fait l'objet ces dernières années de réelles études synthétiques. En effet, les travaux antérieurs ont été consacrés à la synthèse des squelettes typiques ou analogues simples. [49] Actuellement, des travaux de synthèse totale de ces produits utilisant des réactifs sélectifs et stéréospécifiques sont mis au point. [49-51] On peut citer à titre d'exemple la synthèse du germacranolide « isabeline » (Schéma II.5) [48] et de l'élémanolide « zempoaline A et B » (Schéma II.6). [52]

**CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES,  
Méthodes De Séparation Et D'analyse**



**Schéma II.5:** Synthèse de l'isabeline par Wender[51]

**CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES,  
Méthodes De Séparation Et D'analyse**



**Schéma II.6:** Synthèse de la zempoaline A et B par Bartel et Bohlmann[52]

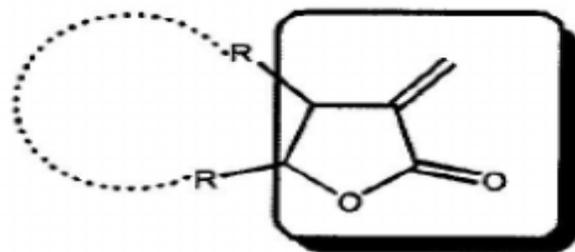
**II.8. Activités biologiques des lactones sesquiterpéniques :**

Les lactones sesquiterpéniques, molécules naturelles également appelées substances amères sont très intéressantes dans le domaine biologique et pharmacologique. Ces substances présentent des propriétés cytotoxique ou antitumorale, antiinflammatoire, antimigraineuse, antioxydante, antifongique, cytoprotectrice gastrique (Tableau II-1) [42-47].

**Tableau II-1** : Les activités biologiques relatives à quelques lactones sesquiterpéniques[53].

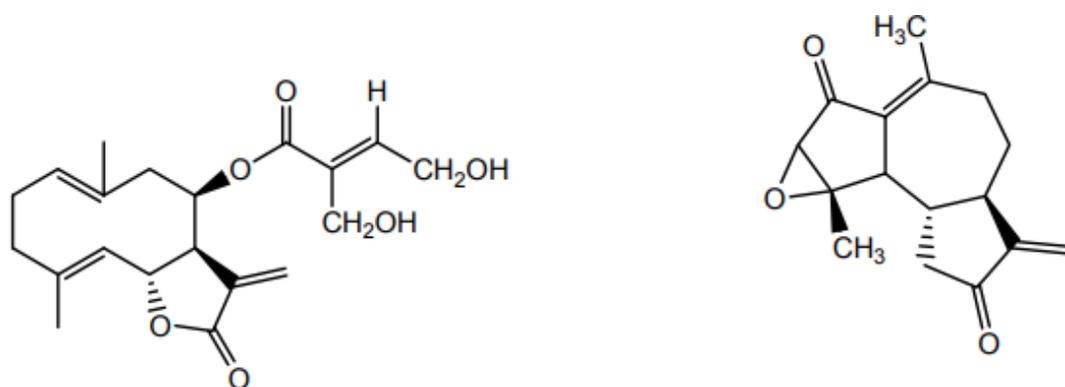
<b>Lactones Sesquiterpéniques</b>	<b>Activitésbiologiques</b>
2 $\alpha$ -hydroxyalantolactone	Antileucémique
Eupaserrine, deacetylepaserrine	Antileucémique
Cumambrine A	Antimicrobienne
Salograviolide	Antifongique
Onopordopicrine	Cytotoxique, antifongique, antibactérienne
Centratherine A	Anti-inflammatoire, antimicrobienne, tripanocidale
Grosheimine	Cytostatique sur cellules KB
Cnicine	Cytotoxique
Parthenine	Genotoxicité

L'activité des lactones sesquiterpéniques est liée à la présence de groupement  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone [45], cette fonction est responsable des activités antibactériennes, cytotoxiques et anti-inflammatoires.



**Figure II.10 :**Structure du groupement  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone[58]

Des recherches portant sur deux sesquiterpène lactones différentes ont prouvé une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses avec un pourcentage d'inhibition de 50% [55]:



**Figure II.11:**Eupantariopierin et 2-oxoudartin [55]

Le 2-oxoludartin possède un méthylène butyrolactone, et aussi epoxy ces deux groupements aident la molécule pour fonctionner selon un mécanisme complexe sur les tumeurs solides comme HL-60(TB), NCI-522(leucémie), RXF393(rein), HCT-116(colon) [55,56].

Dans ce domaine, la recherche a été axée principalement sur la chimiothérapie du cancer. Certains de ces produits y jouent un rôle important [47], on peut citer à titre d'exemple les résultats sur le méthacrylate d'acétate d'érioflorine [48] et ceux sur l'eupacunine [57].

Dans des travaux de recherche systématique d'activité biologique de lactones sesquiterpéniques, Mitchell et coll [53, 54] ont constaté que 52 produits natifs provenant

## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse

---

de la famille des astéracées sont des allergènes forts, cette activité est liée aux mêmes facteurs structuraux conditionnant l'activité cytotoxique. D'autres études d'activité biologique ont montré que certaines lactones sesquiterpéniques sont antibactériennes à l'encontre des germes Gram positif, c'est le cas de l'hénélanine de l'aunée (*Inula helenium* L.) et de la cnicine du chardon béni (*Cnicus benedictus* L) [4].

De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques sont antifongiques d'autres, antiparasitaires. L'artémisinine est un anti malarique qui a donné d'excellents résultats sur l'homme, tandis que l'ambrosine, un pseudoguaianolide d'*Ambrosia maritima* L. est anthelminthique et molluscide.

Les germacranolides par une addition de Michaël donnent des composés Salkylés, ceux-ci s'additionnent sur les fonctions glutathion, thiol et amine (nucléophiles biologiques). Cette interaction va à l'encontre de diverses enzymes et provoque leur alkylation irréversible. On retrouve ces activités dans des anti-inflammatoires de synthèse.

Il y a aussi inhibition de messagers intracellulaires. Ceux-ci ordinairement se dissocient lors de l'activation par un radical libre et un des fragments est transporté jusqu'au noyau où il réagit avec l'ADN pour engendrer un stress inflammatoire. Cette inhibition explique à nouveau l'activité anti-inflammatoire. L'activité anti-ulcère est aussi expliquée par l'addition de Michaël : il y a interaction avec des enzymes de la muqueuse gastrique. Pour terminer on explique l'activité antibactérienne par un blocage cette fois-ci réversible de diverses enzymes au niveau de leurs fonctions thiols ou amines [58]. Malgré l'importance des lactones sesquiterpéniques ces substances peuvent aussi être allergisantes et neurotoxique, car des allergies peuvent apparaître lors d'un contact direct ou indirect avec la plante. Des études ont montré que leur présence dans des plantes est responsable d'empoisonnement de mammifères.

### **II.9. Rôle des lactones sesquiterpènes dans la plante:**

L'interférence qui s'établit entre plantes voisines est attribuée principalement à des effets de compétition pour les ressources environnementales : eau, lumière et substances nutritives. Ainsi de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'inhiber la germination et la croissance des plantes poussant dans leur voisinage. Aussi, faute de mobilité, les plantes ont du s'adapter aux attaques prédatrices d'autres organismes

tels que les insectes, les champignons et les bactéries, cela par des mécanismes chimiques de défense pouvant avoir plusieurs fonctions. Ils peuvent être insecticides, anti-microbiens ou bien herbicides [58-59]

Les lactones sesquiterpènes comme tous les autres métabolites secondaires ne sont pas produits par les plantes pour les bienfaits des humains, mais plutôt pour leur fonction dans la plante.

Ces composés sont essentiels à la croissance saine de la plante et représentent une grande partie de leur défense à des dommages plus ou moins graves. [60] Elles sont principalement rencontrées dans les feuilles et les sommités fleuries de plantes, parfois disponibles, Comme mentionné au début du chapitre, dans une gamme de types de cellules, aussi elles peuvent être détenues dans les organes de stockage tels que les trichomes [60] .

De tels composés agissent comme des phytoalexines, molécules protectrices contre l'attaque microbienne, anti-appétants, à cause de leur goût amer, pour dissuader les herbivores et inversement comme appâts des prédateurs de ravageurs. Les SQL sont des substances allélochimiques: libérées dans la rhizosphère, elles agissent dans la communication plante plante, par exemple, les graines dormantes de l'orobanche (plante parasite) qui déclenchent la germination lorsqu'elles détectent des SQL délivrées par des hôtes compatibles, le tournesol afin d'augmenter ses chances de succès et de reproduction. Il réduit la concurrence dans son environnement local. En effet, plusieurs de ses SQL empêchent la croissance des concurrents en bloquant la germination de plantes des autres familles telles que *Hordeum vulgare* et *Triticum aestivum* [60,61, 62] .

#### **II.10. Allergie au sesquiterpènes lactones**

La peau est un organe complexe, intégré et dynamique qui possède de nombreuse fonction en plus de son rôle de barrière. C'est la première interface moléculaire de l'organisme et la peau est donc en contact permanent avec les molécules présentes dans l'environnement. Elle est de plus exposée à des radiation UV-visible à travers l'exposition solaire. La fonction barrière de la peau est principalement assurée par le *stratum corneum* qui est une barrière efficace contre la perte d'eau transcutanée mais qui est relativement perméable aux molécules organiques lipophiles. Ainsi, au contact des plantes, les

molécules qu'elles contiennent peuvent pénétrer dans l'épiderme et être à l'origine d'effets secondaires toxiques de type phytodermatites (réaction d'irritation, allergie de contact, de phototoxicité, etc...) Ainsi, les plantes contenant des lactones sesquiterpéniques sont probablement responsables de la moitié de tous les cas de phytodermatites rapportés dans la littérature. Cela peut probablement s'expliquer, d'une part, par la fréquence élevée dans notre environnement des plantes contenant des SLs (artichaut, laitue, endives, chrysanthèmes, etc.) et, d'autre part, par la réactivité chimique très élevée de ces lactones.

Deux pathologies dermatologique majeures ont ainsi été associées à une exposition aux molécules contenant un groupement  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone : la dermatite de contact allergique(DCA) et la dermatite actinique chronique(DAC).

### **II.10.1. Dermatite de contact allergique (DCA)**

La DAC est un pathologie immunologique résultant de sensibilisation à un produit chimique qui commence par la modification chimique des protéines épidermiques par l'allergène ou l'haptène.

Le processus de sensibilisation chimique et la réaction allergique qui en découle résultent de l'addition de l'allergène, ou haptène, sur une protéine porteuse de l'épiderme résultent de l'épiderme (Réaction de type 1,4 d'un acide aminé thiolé (-SH) ou aminé (-NH<sub>2</sub>) sur la double liaison exocyclique de l' $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone des sesquiterpènes lactones).

Il ya des études menées sur l'élimination sélective des sensibilisants de contact d'huiles et extraits de plantes ont montré que les  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactones pouvaient également réagir avec des groupes amino (-NH<sub>2</sub>) via une addition 1,4 de type Michael. Inspirés par la réactivité générale des protéines, benzra et al. Avaient pensé à utiliser des nucléophiles fixés sur des polymères insolubles pour enlever les molécules sensibilisantes présentes dans des extraits végétaux utilisés par l'industrie des parfums et cosmétiques [63].

### **II.10.2. Dermatite actinique chronique (DCA)**

Plus récemment, en plus des DCA, il a été rapporté que des DAC pouvaient également se développer après une longue histoire de sensibilisation cutanée aux lactones sesquiterpénique et en l'absence de tout autre facteur exogène identifiable. La DAC, synonyme de la dermatite de photosensibilité persistante et du syndrome actinique réticuloïdes est l'une des formes les plus extrêmes des photodermatoses chroniques. Bien que plus fréquente chez les hommes âgés de plus de 50 ans, des patients plus jeunes des deux sexes, ayant une dermatite atopique préexistante, peuvent également être affectés. La DAC se caractérise par une éruption eczémateuse persistante qui affectés. La DAC se caractérise par une éruption eczémateuse persistante qui affectés principalement la peau exposée au soleil, même si parfois elle s'étende aux zones couvertes. Lors de l'exploration photobiologique, on observe une réduction de la dose érythémateuse minimale (DEM) aux rayonnement ultraviolet B(UVB) mais qui peut s'étende à des longueurs d'onde plus longues (UVA et lumière visible).. [63]

Une forte association avec les DCA à un ou plusieurs allergènes, notamment aux lactones sesquiterpénique, est notée chez les patients atteints de DAC et entre 20% et 75% des patients sensibilisés aux Astéracée présenteraient un certain degré de photosensibilité. Ainsi, l'évolution progressive de l'allergie de contact aux lactones sesquiterpénique vers une DAC à été postulée, même si son origine reste inconnue.<sup>73</sup> Si le tableau clinique initial de la DAC est similaire à celui d'un érythème solaire classique, l'analyse histologique suggère l'implication de chromophores endogènes tels que l'ADN, l'ARN ou des molécules apparentées. <sup>82,83</sup> En conséquence, il a été suggéré qu'une exposition aux lactones sesquiterpéniques pourrait conduire aux deux pathologies, mais ferait intervenir des mécanismes et des cibles biologiques différentes. De plus, à partir du comportement chimique démontré des  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactones (accepteurs de Michael), il n'était pas évident que la lumière puisse jouer un rôle dans l'interaction de ces molécules avec des structures biologiques, même si une alkylation de l'ADN pouvait être une hypothèse [63].

## **II.11. Les méthodes de séparation et d'analyse des lactones sesquiterpéniques**

### **II.11.1. Les Méthodes de séparation :**

Les travaux de la littérature montrent que plus de 90% des lactones sesquiterpéniques isolées et déterminées l'ont été à partir d'espèces de la famille des composées. Cependant, bien que certaines plantes soient de grandes accumulatrices de ces métabolites, le passage par des techniques de séparations chromatographiques différentes est obligatoire pour les atteindre [64]. Chercher des lactones sesquiterpéniques et faire leur séparation commence d'abord par l'extraction d'une quantité importante de plante macérée dans du méthanol ou de l'éthanol (solvant polaire) en présence ou non d'eau. Après filtration et concentration, l'extrait obtenu additionné d'eau distillée subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante menant ainsi à une séparation partielle en fonction de la polarité des constituants. En général, ce travail débute par de l'hexane ou de l'éther de pétrole pour récupérer les cires et les hydrocarbures suivi par au moins trois extractions au chloroforme pour avoir les lactones sesquiterpéniques moyennement polaires. Ces deux étapes sont suivies par une extraction à l'acétate d'éthyle dont l'extrait pourrait contenir des lactones sesquiterpéniques trop fonctionnalisées et enfin par des affrontements au n-butanol pour rechercher les produits beaucoup plus polaires tels les hétérosides souvent de type flavonoïde.

Les phases organiques ainsi obtenues sont séchées, concentrées et soumises à la batterie chromatographique pour la séparation. Les techniques usuelles utilisées pour la séparation des lactones sesquiterpéniques sont en général la chromatographie sur colonne et la chromatographie sur couche mince.

#### **II.11.1.1. Définition de la chromatographie**

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue: les deux phases étant mises en contact intime et à contrecourant.

#### **II.11.1.2. Chromatographie sur couche mince :**

## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse

---

Tout d'abord cette technique permet de façon générale l'analyse des fractions en ayant une idée de la polarité des différents composés en fonction de l'affinité avec les solvants de migration, donc elle est employée pour la recherche du système de solvant avant d'entreprendre une étape de séparation. Elle est également utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

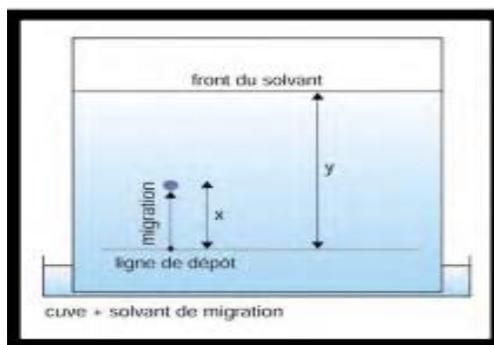
Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Silicagel.

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. L'observation des CCM s'effectue sous UV (254 et 365 nm) et, dans certains cas, révélation par les réactifs appropriés

On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal ( $R_f$ ).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

Cette dernière technique de révélation peut donner des informations sur la nature et la position de certains substituants sur le squelette sesquiterpénique de type guaianolide de la lactone en question en fonction de la couleur que prennent les spots après chauffage. Par exemple, une couleur verte indique la présence d'un groupement chlorométhylène en C-4 et un groupement hydroxyle en C-3 [66].



FigureII.12 : plaque chromatographique [66]

### **II.11.1.3. La chromatographie sur colonne**

Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille [67] .

Les lactones sesquiterpéniques ont des polarités similaires. En effet, leur séparation en produits purs est souvent complexe et consomme énormément de temps et de solvants. L'étape initiale pour leur séparation est la chromatographie sur colonne utilisant le gel de silice comme phase stationnaire élue par des systèmes de solvants en mode gradient ou en mode isocratique. Cette étape doit être précédée par une analyse par chromatographie sur couches minces pour rechercher l'éluant donnant la meilleure séparation. [68].

### **II.11.1.4. chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENES, Méthodes De Séparation Et D'analyse

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [69].

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant : [70]

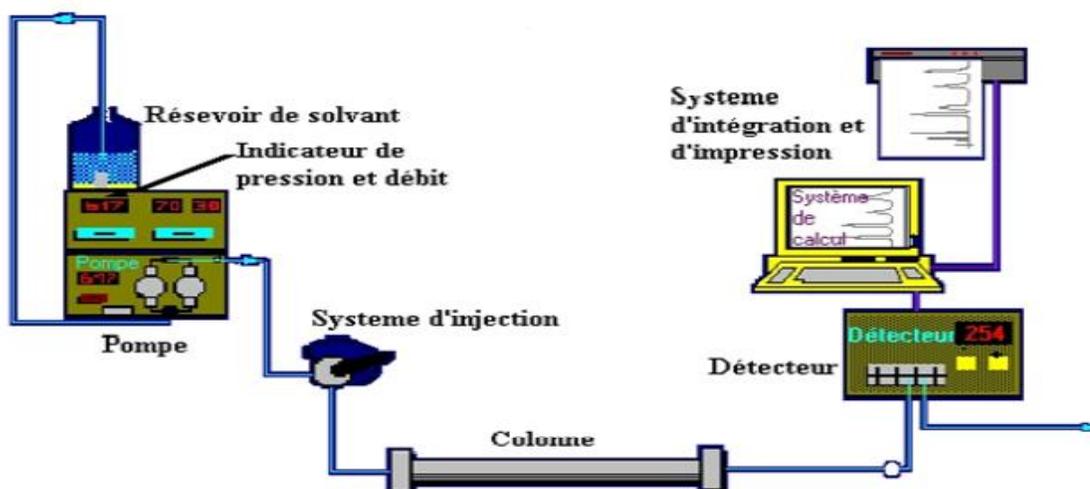


Figure II.13 : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC [70]

### II.11.2. Les Méthodes d'analyse :

#### II.11.2.1. La spectrométrie UV-visible :

Les techniques de spectroscopie UV-Vis sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés structurales et les caractéristiques optiques des composés.

C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque chromophore absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules.

La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins [71] .

### **II.11.2.2. La spectroscopie Infrarouge :**

La spectroscopie d'absorption infrarouge (IR) montre la présence de la fonction  $\gamma$  - lactone  $\alpha$ ,  $\beta$ -saturée ou  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée par l'existence de bandes caractéristique à 1780 ou 1755  $\text{cm}^{-1}$  respectivement. Les bandes à 1740, 1735 et 1720  $\text{cm}^{-1}$  respectivement confirment la présence d'un groupement acétate [72,73] , esters saturés et esters insaturés cette étape est définie comme étape initiale de l'identification des sesquiterpéniques.[74]

### **II.11.2.3. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$ , le phosphore  $^{31}\text{P}$ , et l'azote  $^{15}\text{N}$ . Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , etc. ...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin ». la technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomique en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant déterré qui peut être du méthanol du chloroforme, de la pyridine etc... Ces solvant possèdent des déplacements chimiques spécifiques. Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à la l'élucidation structurale.

La RMN est la technique la plus performante dans la recherche structurale des lactones sesquiterpéniques. En effet les expériences multi impulsionsnelles et bidimensionnelles homo et hétéronucléaires permettent non seulement d'arriver à la structure mais peuvent donner d'excellentes informations sur la stéréochimie du centre asymétrique.[75]

#### **II.11.2.4. La spectroscopie de masse (SM)**

La spectroscopie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduites dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés de la nature des substituants sur le squelette sesquiterpénique.[76]

#### **II.11.2.5. La diffraction des rayons X (DRX)**

Est également très utilisée. Elle donne toutes les informations nécessaires à l'établissement de la structure y compris la stéréochimie des centres chiraux mais exige une bonne cristallisation de l'échantillon.[79]

# CHAPITRE III

## L'ETUDE

## EXPERIMENTALE

### III.1. INTRODUCTION :

Dans notre étude nous avons consacré à l'étude phytochimique de la plante marrubium vulgare qui concerne macération et extraction des sesquiterpènes lactones par les différents solvants organiques, contrôles et analyse par la chromatographie sur couche mince, et les tests antimicrobiens de l'extrait chloroformique.

### III.2. Etude phytochimique

#### III.2.1. Le matériel végétal

On récolte la partie aérienne (feuilles et tiges) de Marrubium vulgare (marrube blanc) au tout début de sa floraison, fin mai début juin, et on les fait sécher à l'ombre, dans un lieu sec et aéré, sur des claies ou bien en les suspendant en petits bouquets. Bien entendu, si on n'a pas fait de récolte, on peut aussi se procurer la plante sèche dans les magasins de produits.



Figure III.1 : Marrubium vulgare L

#### III.2.2. Extraction des sesquiterpène lactones

##### III.2.2.1. Extraction par macération

###### ✓ Le principe

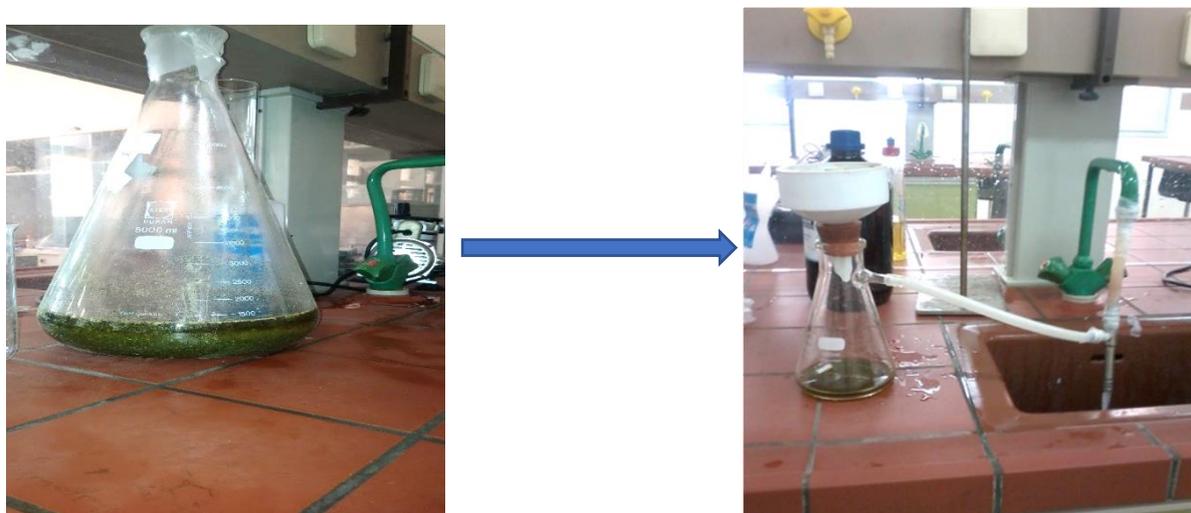
La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, l'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles.

### ✓ Mode opératoire

La méthode que nous avons utilisée est la macération hydroalcoolique car elle repose sur la solubilité de la sesquiterpène lactone dans les alcools (éthanol, méthanol).

Un poids de 170 g de matériel végétale pulvérisé est mise à première macération dans le mélange (éthanol + Eau) avec les proportions (70% / 30%) pendant 24 heures à température ambiante.

Après filtration sur Büchner, le filtrat obtenu est évaporé à sec (45°C) à l'aide d'un rotavapor, l'éthanol récupéré est réutilisé dans la deuxième macération pendant 24h, après la filtration, le filtrat obtenu est concentré à sec sous pression réduite pour éliminer l'éthanol.



**Figure III.2 :** macération hydroalcoolique puis filtration sur Büchner

### III.2.2.2. Extraction liquide-liquide

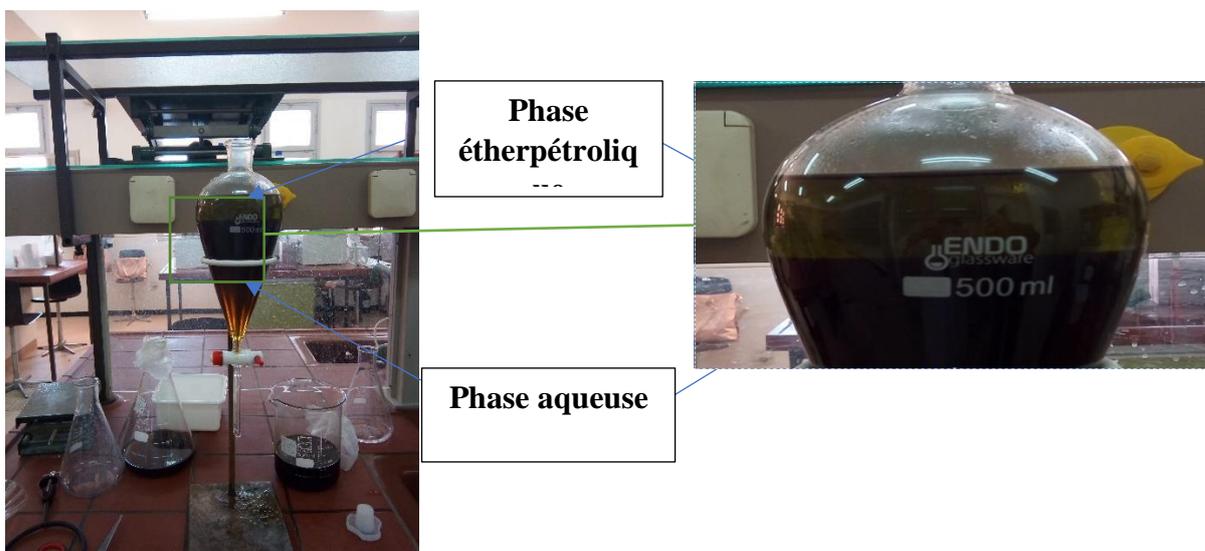
#### ✓ Le Principe :

L'extraction liquide-liquide consiste à faire passer une substance qui nous intéresse d'un solvant, dont elle est souvent difficile à séparer, à un autre (appelé solvant d'extraction), dont elle sera facilement isolable. Cette opération, réalisée habituellement par agitation, est possible à condition que les deux solvants soient très peu ou pas miscibles entre eux.

### Mode opératoire

#### III.2.2.2. 1. Extraction par l'éther de pétrole

Dans une ampoule à décanter on introduit 200 ml d'éther de pétrole qui est moins polaire que l'eau, après l'agitation et décantation des deux phases on récupère la phase aqueuse qui est en bas. Cette étape est répétée deux fois pour éliminer les cires, la chlorophylle, les lipides, et les hydrocarbures (figure III.3).



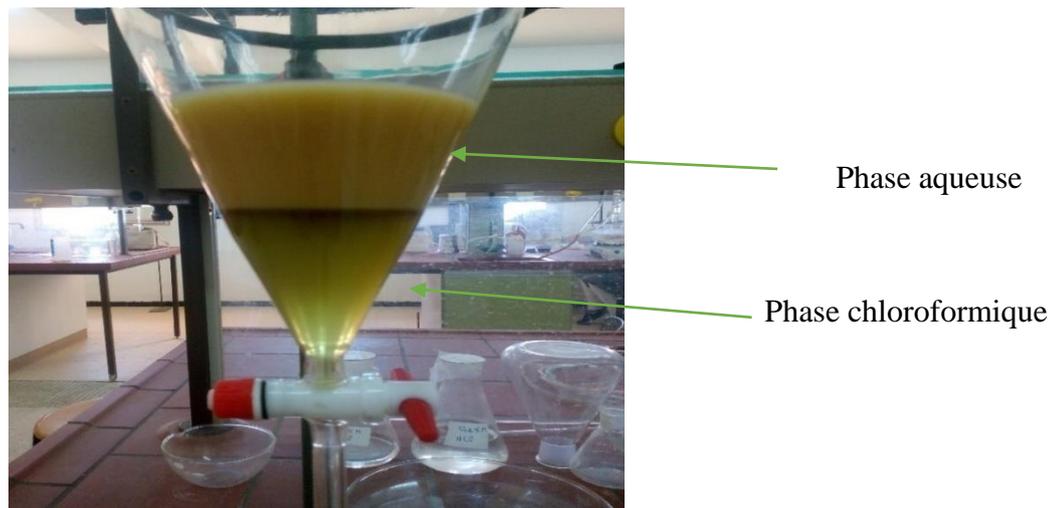
**Figure III.3** : Extraction liquide-liquide par l'éther de pétrole

#### III.2.2.2.2. Extraction par le chloroforme

Le chloroforme est plus dense que l'eau et plus polaire que l'éther de pétrole donc il est sensé entrainer les composés semi polaire tel que les terpénoïdes.

Dans une ampoule à décanter on ajoute 200 ml de chloroforme à la phase aqueuse et on voit après l'agitation les deux phases sont apparait clairement. on récupère la phase organique (en bas).

On répète cette étape deux fois pour obtenir les sesquiterpène lactones de polarité moyenne. (figure III.4 )



**Figure III.4** : extraction liquide-liquide par chloroforme

### III.2.3. Évaporation sous vide

Il s'agit d'un appareil permettant de réaliser une distillation simple sous pression réduite. On l'utilise en fin de réaction (après extraction et séchage de la phase organique), lorsque le ou les produit(s) organique(s) souhaité(s) sont dissous dans un solvant organique (chloroforme, toluène, éther...) (figure III.5).

L'objectif est d'éliminer le solvant et de récupérer le ou les constituants de la phase organique. Pour cela on réalise un vide partiel dans l'enceinte de l'appareil. La conséquence est que les températures d'ébullition des constituants et du solvant sont abaissées considérablement (il existe des abaques pour connaître la température d'ébullition d'un produit connaissant cette température à pression atmosphérique et la pression dans l'enceinte).

Il se produit donc une distillation rapide du solvant (beaucoup plus volatil que les produits de réaction) et donc petit à petit on sépare le solvant des composés organiques. Lorsqu'il n'y a plus de solvant dans le ballon, on obtient en général une huile visqueuse.

L'évaporateur rotatif (figure III.5) est utilisé pour éliminer le chloroforme et donner l'extrait de chloroformique (Figure III.6).



**FIGURE III.5** : Evaporateur rotatif



**Figure III.6** : l'extrait chloroformique

Le schéma suivant représente le protocole d'extraction des lactones sesquiterpènes (schémas III.1).

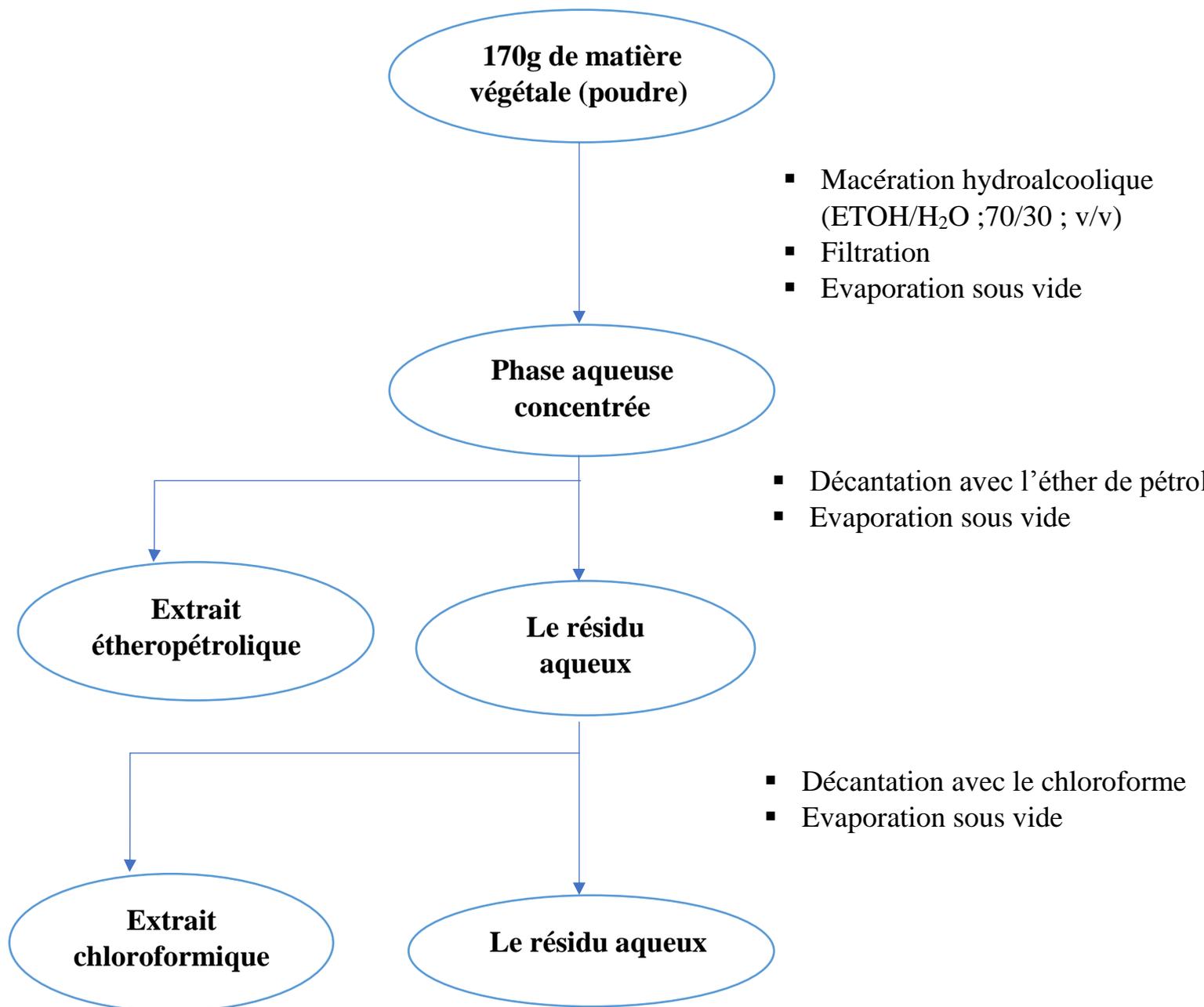


Schéma III.1: Schéma générale de l'extraction

### **III.2.4. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Pour analyser L'extrait chloroformique (figure III.6), on utilise l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

#### **III.2.4. 1.Principe de la CCM**

Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Il est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou éluant) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Après migration les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui peut se faire soit par :

- ✓ Pulvérisation d'un réactif caractéristique
- ✓ Par immersion dans un bain de permanganate de potassium
- ✓ Par pulvérisation de vapeur de diiode
- ✓ Par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence

#### **Mode opératoire**

Dans ce travail, la CCM a été utilisée pour la séparation et la mise en évidence des composés présents dans l'extrait chloroformique obtenu afin de vérifier le meilleur système d'élution.

#### ✓ **Les principaux éléments du CCM**

Cuve à chromatographie : Un récipient en verre fermé par un couvercle étanche. (Figure III.7)

Phase mobile (éluant ou système des solvants) : (Tableau III.1)

Phase stationnaire : Le plus utilisé est le gel de silice, c'est une couche d'environ 0,25 mm fixée sur une plaque d'aluminium.

**Echantillons** : l'extrait chloroformique.

**Révélateurs** : les taches ne sont pas visibles donc on a utilisé un révélateur chimique qui est mélange de (4.6ml de benzaldéhyde, 232ml d'éthanol, 2.6ml d'acide méthanoïque et 8.5ml acide sulfurique), (figure III.8).

Après révélation, on a chauffé la plaque CCM dans l'étuve à 80°C (figure III.9) et on a observé les couleurs des taches.



**Figure III.7** : Analyse par CCM



**Figure III.8** : le révélateur chimique

Le tableau suivant représente les systèmes d'élution utilisés :

**Tableau III.1**:les systèmes d'élution utilisés.

Eluant	Système des solvants (v : v : v : v)
ET <sub>2</sub> O/éthanol	(1 :9)
Chloroforme/éthanol	(9.9 : 0.1)
Hexane/chloroforme/Acétate d'éthyle	(3 :3 :3)
Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone	(3 :3 :4)
H <sub>2</sub> O/méthanol/Acétyle acétone	(7 :3 :1)
Butanol/éthanol/Acide Acétique	(1.5 :2 :1)

Le but d'utilisation de plusieurs systèmes d'élution est pour savoir le meilleur éluant qui donne une meilleure séparation et donc utilisé dans la chromatographie sur colonne.

### **III.5. Etude de L'activité antibactérienne :**

#### **❖ Objectif**

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'extrait Chloroformique en testant in vitro diverses espèces bactériennes.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de disques). Ce test est réalisé au niveau du Laboratoire des analyses bactériologique de l'hôpital Rzig Ibrahim à Boussaâda et pour confirmer mes résultats j'ai fait des expériences similaires avec plus des souches bactériennes dans labo de microbiologie de centre de recherche (CRSTRA) à Biskra.

- ✓ on note le travail dans l'hôpital : test 1
- ✓ et le travail dans labo de CRSTRA : test 2

#### **III.5. 1. Généralités sur les bactéries et les antibiotiques**

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bactérie.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1  $\mu$  m. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (Cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [80] .

### **III.5. 2.Les antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [81].

### **III.5. 3.Les cibles bactériennes des antibiotiques**

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens [82].

### **III.6. Principales caractéristiques des souches testées**

Les souches bactériennes utilisées dans cette recherche pour l'activité antibactérienne sont des souches référencées une gram + c'est: (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une souche gram- (*Escherichia coli* ATCC 25922),(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853). ces souches obtenues de l' Institut de Pasteur de Msila ,les autres souches dans labo de crstra sont : *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus aureus*,*Pseudomonas aeruginosa*.

#### **III.6.1. Description de quelques bactéries étudiées**

##### **a-*Escherichia coli* ATCC 25922**

*Escherichia coli* est un bacille à gram négatif [83], de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm.

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires. [84]



**Figure III.9** : Des colonies d'E Coli

### **b-Staphylococcus aureus**

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré.[86]. *S. aureus* représente la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée. [84]



**FigureIII.10** : Des colonies de*S. aureus*

### **c-Pseudomonas aeruginosa**

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont mobiles grâce à une

ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* forme ni spores ni sphéroplastés. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3<sup>ème</sup> rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1<sup>er</sup> rang pour les infections pulmonaires basses et le 3<sup>ème</sup> rang pour les infections urinaires [85] .



**Figure III.11:** Des colonies de *P. aeruginosa*

### **d-Bacillus Cereus**

Le *Bacillus cereus* est une bactérie appartenant à la catégorie des Bacillaceae. Cette bactérie résiste à de hautes températures (plus de 100 °C), une des raisons pour laquelle elle est mise en cause dans de nombreuses infections alimentaires. Le *Bacillus cereus* entraîne deux formes d'intoxications alimentaires généralement bénignes : la première est dite émétique, c'est-à-dire qu'elle se manifeste par des nausées et des vomissements, la deuxième se manifeste par l'apparition de diarrhées

### **III.6.2. Méthode de diffusion en milieu gélose**

#### **III.6.2.1. Les milieux de culture**

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

suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries d'extrait De MARRBIUM VULGARE.

### **III.6.2.2. Préparation des dilutions des extraits**

Des dilutions sont préparées à partir d'une solution mère (extrait+2ml d'ETOH), 1/2, 1/4 et 1/8.

Remarque : dans labo de CRSTRA (test 2) nous avons utilisé la même méthode mais L'extrait est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), comme solvant et nous avons utilisé juste la solution mère de concentration 0.5 g/ml.

#### ✓ **Conditions de travail :**

- Toute la verrerie a été lavée à l'eau distillée.
- Le séchage et la stérilisation du matériel utilisé ont été réalisés à l'étuve ou à l'autoclave
- l'extrait doit être stérilisé par micro-filtre
- Toutes les manipulations lors de travail sont réalisées près du bec bunsen pour éviter la contamination des milieux ou du matériel.

### **III.6.2.3. Préparation des disques**

Les disques sont préparés à partir de papier wattman avec un diamètre de 6 mm. Ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave (Annexe 04) et conservés jusqu'à l'utilisation.

### **III.6.2.4. Préparation du milieu de culture**

On met le stérilisation et la surfusion de milieu de culture (Muller Hinton) à l'aide d'autoclave pendant 15 min à 121°C, puis on le verse dans les boîtes de Petri à 4 mm de hauteur (figure 22) et on laisse quelques minutes jusqu'à la solidification

### **III.6.2.5. Inoculum**

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler Par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- L'ensemencement doit se faire en moins en quelques min après la préparation de l'inoculum

### III.6.2.6.Ensemencement

- La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzen;
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse) ;
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas ;
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose; (figure III.12).
- Les disques sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au Bec bunzen.

### III.6.2.7.déposition des disques

Dans le premier test (test 1) : nous avons déposé 5 disques sur la surface de gélose (4 disques contenues d'extraits à des différents concentrations et 1 disque contenue seulement l'éthanol **E** comme Témoins négatif).

Dans le deuxième test (test2) :3disques sont déposés (un disque de solution mère de l'extrait, un disque de DMSO comme témoins négatif et un disque d'antibiotique de gentamicine comme témoin positive).

- ✓ Le DMSO sans extrait a été utilisé en tant que contrôle négatif et n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance microbienne.



**Figure III.12** : technique d'ensemencement



**Figure III.13** : déposition des disques

#### **III.6.2.8. Incubation et Lecture**

Après incubation 18-24 heures à 37°C dans l'étuve, Les résultats sont observés, en mesurant les diamètres d'inhibition et comparer aux valeurs critiques.

**Non sensible (-)** ou résistante : diamètre < 8mm.

**Sensible (+)** : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

**Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19 mm.

**Extrêmement sensible (+++)**:diameter > 20 mm.



# CHAPITRE IV

RÉSULTAT

ET

DISSCTION

**IV.1. Rendement et propriétés organoleptiques :****IV.1.1. Calcul de rendement**

Le rendement de l'extrait chloroformique obtenu est calculé comme suit :

$$R (\%) = 100 \times m_{\text{ext}}/m_{\text{éch.}}$$

Où  $m_{\text{ext}}$ : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g

$m_{\text{éch}}$ : la masse sèche de la plante en g

$m_{\text{ext}}$ = (le poids de creuset + l'extrait) -(le poids de creuset)

$$m_{\text{ext}} = 1.5\text{g}$$

$$m_{\text{éch}} = 170\text{g}$$

$$R (\%) = (1.5(\text{g})/170(\text{g})) \times 100$$

$$= 0.8 \%$$

**IV.1.2. Caractéristiques organoleptique de l'extrait chloroformique**

Couleur	Aspect
Vert foncé	Solide

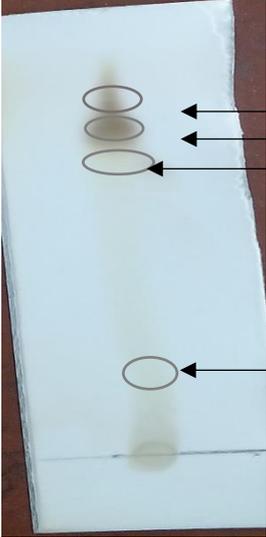
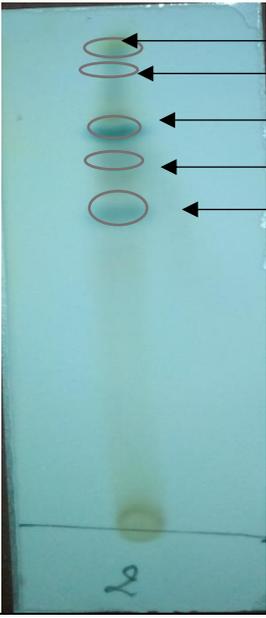
**IV.2. Les plaques CCM**

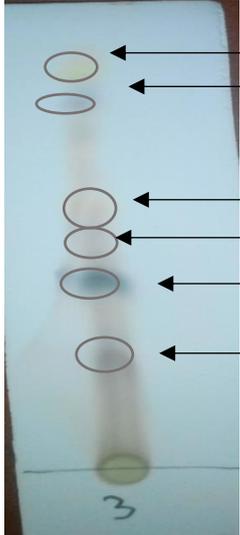
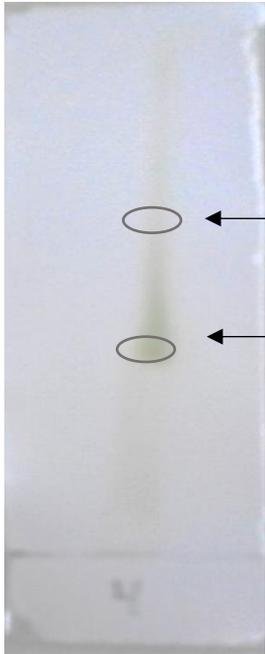
Le suivi d'extrait chloroformique par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant différents systèmes a montré plusieurs tâches de nombres, de couleurs et de distances d'migrations différents.

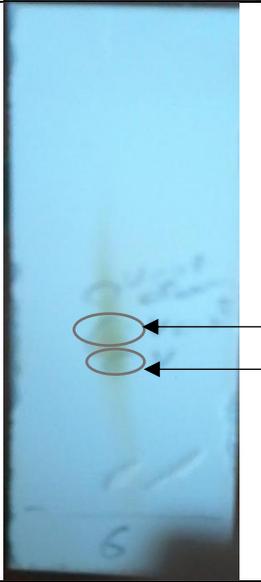
Cette technique peut donner des informations sur la nature et la position de certains substituants sur le squelette sesquiterpénique de la lactone en fonction de la couleur que prennent les spots après chauffage. Par exemple, une couleur verte indique la présence d'un groupement chlorométhylène en C- 4 et un groupement hydroxyle en C-3. [86]

Après plusieurs essais, le meilleur système qui nous a montré la meilleure séparation des tâches sont présentés dans le tableau suivant (Tableau IV.1).

**Tableau IV.1.** : Chromatogrammes obtenus pour l'extrait chloroformique

Eluant	Chromatogramme
ET <sub>2</sub> O/éthanol	 <p>Mauve Marron Jaune Vert claire</p>
Chloroforme/éthanol	 <p>Jaune Vert clair Vert foncé Jaune claire Mauve claire</p>

<p>Hexane/chloroforme/Acétate d'éthyle</p>	 <p>Jaune</p> <p>Mauve claire</p> <p>Rose claire</p> <p>Mauve claire</p> <p>Vert foncé</p> <p>Mauve foncé</p>
<p>Toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone</p>	 <p>Jaune claire</p> <p>Vert clair</p>

H <sub>2</sub> O/méthanol/Acétyle acétone		Jaune claire
Butanol/éthanol/Acide Acétique		marron Vert claire

Le but d'utilisation de plusieurs systèmes d'éluant est pour savoir le meilleur éluant qui donne une meilleure séparation et donc utilisé dans la chromatographie sur colonne.

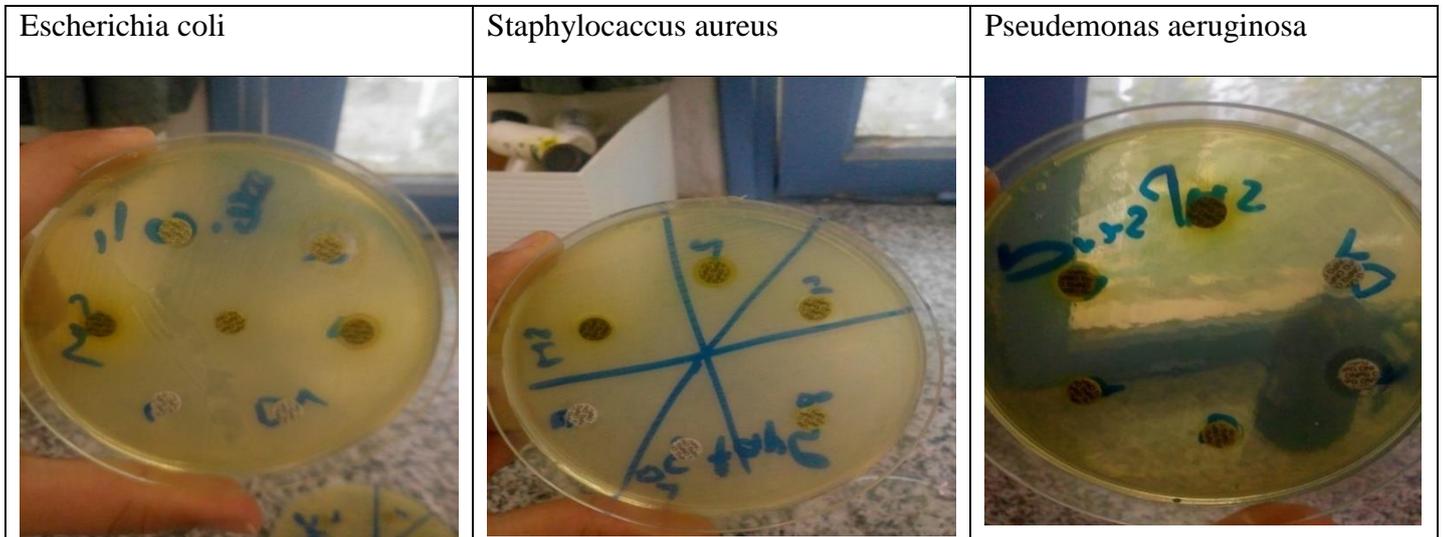
Dans notre travail le meilleur système est :

- Hexane/chloroforme/Acétate d'éthyle:(3 :3 :3)

IV.3. Activité biologique

IV.3.1. Résultats du test du pouvoir antibactérienne

a. Le résultat de test n°1 (test à l'hôpital)



FigureIV.1 : résultats des zones d'inhibition

L'activité antibactérienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

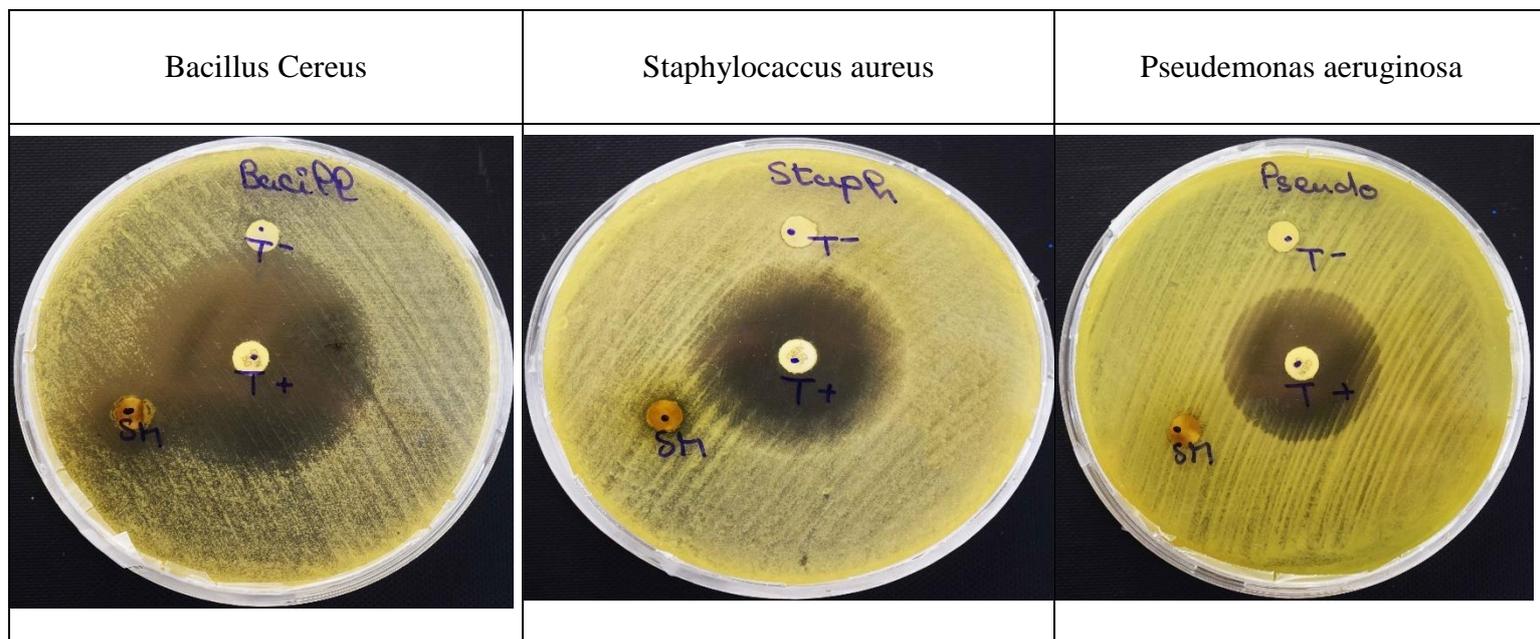
TableauIV.2 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique

Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique					
Dilutions Souches	Sm	1/2	1/4	1/8	E
Escherichia coli	7	8	14	14	12
Staphylococcus aureus	7	9	11	10	10
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	8

TableauIV.3 : la sensibilité des bactéries pour l'extrait chloroformique

La sensibilité des bactéries pour l'extrait chloroformique					
Dilutions Souches	Sm	1/2	1/4	1/8	E
Escherichia coli	-	-	++	++	+
Staphylococcus aureus	-	-	+	+	+
Pseudomonasaeruginosa	-	-	-	-	+

b. Le résultat de test n°2 (test au CRSTRA )



FigureIV.2 : zones d'inhibition

TableauIV.4 :Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique

Diamètres des zones d'inhibitions (mm) pour l'extrait chloroformique		
Souches	Solution mère 0.5g/ml	Témoin négatif (DMSO)
Bacillus Cereus	15	-
Staphylococcus aureus	8	-
Pseudomonasaeruginosa	-	-

IV.4.Discussion des résultats :

Le test 1 :

- Tous les souches bactériennes étudiées présentent une sensibilité limitée pour l'éthanol .
- **Escherich Coli :**  
Très sensible pour la dilution 1/8 et 1/4, et non sensible pour la solution mère(Sm) et la solution 1/2.

➤ **Staphylococcus aureus :**

Sensibilité limitée pour les dilutions 1/4 et 1/8 et non sensible ou la bactérie résistante pour la solution mère et la solution 1/2.

➤ **Pseudomonas aeruginosa**

La bactérie résistante pour toutes les dilutions

**Le test 2 :**

➤ **Le DMSO présentent aucune action pour tout les souches bactériennes étudiées**

➤ **Bacillus Cereus**

Très sensible pour la solution mère de concentration 0.5g/ml

➤ **Staphylococcus aureus :**

Sensibilité limité pour la solution mère

➤ **Pseudomonas aeruginosa**

Aucune zone d'inhibition c'est-à-dire la bactérie résistante sur l'extrait.

## *CONCLUSION GÉNÉRALE*

---

Le travail de cette recherche consiste à une étude phytochimique et biologique d'une plante de la famille des lamiacées ; marrubium vulgare L une plante utilisée localement pour le traitement traditionnel du diabète

L'étude bibliographie commence par une identification botanique en générale de la plante marrubium vulgare L. ensuite on commençant l'étude par l'extraction hydroalcoolique des sesquiterpènes lactone, suivie par un contrôle avec la chromatographie sur couche mince (CCM) qui indique que cette espèce est riche en sesquiterpènes lactone.

Dans la partie biologique les résultats obtenus, montrent que l'extrait chloroformique de partie aérienne du Marrubium Vulgare L ne possède pas d'activité antibactérienne du pour les germes testés et aux dilutions employées.

Les souches étudiées qui présentent une sensibilité vis-à-vis a l'extraits de la plante, avec un maximum d'inhibition sur Bacillus Cereus (zone d'inhibition de 14mm) et un minimum d'inhibition sur Staphylococcus aureus (zone d'inhibitions de 8 mm). Les résultats indiquent que l'extrait possèdent une activité antimicrobienne faible sur les souches testées.

Cette inactivité trouvée dans notre travail, et en dépit de la composition importante des sesquiterpènes lactone de cette plante en composés doués d'effet antibactérien est due probablement à plusieurs facteurs, parmi lesquels:

- les conditions de conservation, de stockage et de transport.
- le procédé et les conditions d'extraction.
- la concentration de l'extrait utilisée.
- la diffusion de l'extrait à travers la gélose.
- l'état physiologique de la bactérie, etc.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIES**

- [1] Azzi R, Lahfa F and Djaziri R., 2014: Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. in normal and streptozotocin induced-diabetic wistar rats. *Int J Pharm Sci Res* 2014; 5(5): 2006-13.
- [2] Bellakhdar. J., 1997: Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : Dunes France. p 341.
- [3] Schauenberg P., Paris F. (1977). Guide to medicinal plants. Guildford, Lutterworth Press. 349p
- [4] Bruneton. J., « Pharmacognosie phytochimie plantes, médicinales », Ed. Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 2ième édition, 226-300, 314-325, 229-240, 301-309. 1999.
- [5] Decaux I. (2002). *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6.
- [6] Iserin, P, 2001. Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10,335
- [7] Volák, J., et Stdola, J., « Plantes médicinales ». GRÜND, Paris. 1983
- [8] J. Buckingham, Dictionary of Natural Products. Version 9.2 on CD-ROM. Chapman & Hall/CRC Press, London, New York (2004)
- [9] A. Lamarti, A. Badoc, G. Deffieux, JP. Carde, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.133(1994) 79
- [10] NS. Sangwan, AHA. Farooqi, F. Shabih, RS. Sangwan, Plant Growth Regul. 34(2001) 3.
- [11] B.M ange, R. Croteau, Curr. Opin. Plant Biol. 2(1999b) 139
- [12] Olivier G ,Imaël H,Nestor B 22 September 2017 Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance against *Anopheles*Species Complex Giles 22(10)
- [13] JUDD., CAMPBELL., KELLOGG., STEVENS. « Botanique systématique – une perspective phylogénétique ». Edition De Boeck-université. Janvier 2002.
- [14] Ouahas. C., « Chimie Organique, Sciences biomédicales et Sciences de la nature », Office des Publications Universitaires, Alger, 413. 1996.
- [15] Khadija. R «Etude du mécanisme de l'action bactéricide de HE sur *Mycobacterium Phlei* et *Mycobacterium fortuitum* », Thèse de Doctorat d'état. En biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Fès, 2002.
- [16] Carson C.F. & Riley T.V. « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* » *J. Appl Bacteriol*, 78(3): 264-269. 1995.
- [17] Fulbert J. C, Cals M. J., « les Radicaux libre en biologie clinique ». *Panthol. Biol*, 49 (1), 66-77. 1992.
- [18] Erlund, 2004Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quecetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- [19] Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493).

- [20] Brouillard, R., « The Flavonoids », Advances in research sine, 1986, Ed. J. B. Harbone, Chapman and Hall, London, 525-538, 1993.
- [21] Harbone, J. B., « The Flavonoids », Mabry, TM. Mabry H. Eds: Chapman et Hall, London. 1975.
- [22] Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. « Intérêt nutritionnel des flavonoïdes » .Méd. Nut. 32 (1) : 17-27. 1991.
- [23] Ribereau-Gayan. P et Gautheret. R. T., « Botanique général », Deboeck university, Allmagne, 21, 1998.
- [24] Bruneton. J., « Pharmacognosie phytochimie plantes, médicinales », Ed. Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 2ième édition, 226-300, 314-325, 229-240, 301-309. 1999.
- [25] Malne, J, F. Parve, M., Kam, A., Mckevy, A., Ahmed, I. and Bhatta, M. « Journal of the Chemical Society ». Perkin Transactions II, 1683. 1980
- [26] Kothe, H.W.2007.1000 plantes aromatiques et médicinales.Terres.Pp.10-13
- [27]Guy fuinel arbre et plantes médicinales du jardin, édition fernand lanore 2002 , ISBN 2-85151-227-X
- [28] Aouadhi S., 2010 : mémoire Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes
- [29] Quezel P., Santa, S., 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed : CNRS. Paris. 360-361 p.).
- [30] Créte P., 1965. Précis de Botanique : Systématique des Angiospermes. Tome II. 2e Ed: Masson, Paris. pp. 368-371.
- [31] Ozenda P., 2004. Flore et végétation des sahara. 3ème Ed : CNRS édition. Paris. pp.399-402.
- [32] Rigano D., Apostolides A. N., Bruno M., Formisano C., Grassia A., Piacente S., Piozzi F., Senatore F., 2006. Phenolic compounds of *Marrubium globosum ssp. libanoticum* from Lebanon. Biochemical Systematics and Ecology. 34: 256-260.
- [33] Decaux I. (2002). *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6.
- [34] Baba aissa F., 1999 : Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algerie, Ed Librairie moderne- Ruiba.p.46-47-194-195-231
- [35] Bonnier G., 1990 : La grande Flore française Ed.Bllin ; Complète. Tome : 09  
La Végétation de la France, Suisse et Belgique.26- 25
- [36] Valnet J., 1983 : Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes, Ed Maloine S. A. Paris.
- [37] Ashkenazy D., Friedman J., Kashman Y., 1983. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. Journal of Medicinal Plant Research, 47: 218-220.)

- [38] Guignard J.L., 2001. Botanique systématique moléculaire. Ed: Masson. Paris. 290 p
- [39] Fraga, B., Naturel sesquiterpenoides, Naturel product reports, 1998 :15 ; 73-92.
- [40] D. Haturvedi, 2011, Opportunity, Chall. Scop. Nat. Prod. Med. Chem. 313-334
- [41] M. Bruno, S. Bancheva, S. Rosselli, A. Maggio., 2013, Phytochem., 95:19-93.,
- [42] Kahlek, W. (1830) *Arch. Pharm.*, **34**, 318, *Belsteins Hanbuchder organischen chimie*, (1933).**17**, 499.
- [43] Ruzika.L, The Isoprene Rule and The Biogenesis Of Terpenic Componds, *Experientia*, 1953 :9 ; 357.
- [44] Ruzika.L, Faraday leecture, History Of The Isoprene Rule, *Proc. Chem.Soc*, 341, London 1959.
- [45] Hendrickson .J.B, Stereochemical Implications In Sesquiterpene Biogenesis, *Tetrahedron*, 1959 :7 ; 82.
- [46] Medjroubi, K, Thèse de magister, Université de Constantine ,1991.
- [47] Bandyukova, V.A, Khalmatov, Kh.Kh, and Alimov, Kh.I., *Khim.Prir.Soedin*, 1969:5(4) ;324-325.
- [48] JANG, D. S., YANG, M. S., HA, T. J., PARK, K. H. (1998), *Phytochemistry*, 49,157.
- [49] Fisher, N.H., Mabry, T.J., Kajan, H.B. (1968). *Tetrahedron lett.*, 24, 9041.
- [50] Marchal, J.A., Wuts, P.G.M. (1978). *J. Org. Chem.*, 43, 1086. [48] Grieco,P.A., Chfuney, K., Majetich, G. (1977). *J. Amer Chem.Soc.*, 99, 7393
- [51] Wender, P.A., Lechleiter, J.C., (1980). *J. Amer Chem.Soc.*, 102, 6340.
- [52] Bartel, S., Bohlmann, F., (1989). *Tetrahedron lett.*, 29, 3929-32.
- [53] HLADON, B., DROZDZ, B., HOLUB, M., SZAFAREK, P., KLIMASZEWSKA, O. (1975), *Arch Immunol Ther Exp*, **23**, 845.,
- [54] Rucker.G, Klemens.H, Schenkel.E, *J. Indian Inst. Sci.*, May–June 2001, 81, 333–334.:
- [55] Doskotch.R.W., El feraly. F. S, Cytotoxic sesquiterpenes from *Liriodendron tulipifera* L., *J. Org. Chem.*,1970 : **35** ; 1928–1936.
- [56] Kupchan, S. M., Davies, V. H., Fujita, T., Cox, H. R., Brayn, R. F. (1973). *J. Org. Chem.*, 38, 1853.
- [57] Mitchell, J. C., Dupuis, G., Brit, J., (1971). *Dermatologie*, 84, 139.
- [58] Geissaman, T. A. (1966). The biosynthesis of sesquiterpenes lactones of the *compositae*, 6.
- [59] F. A. Macias, J. C. G. Galindo, D. Castellano, R.Velasco., 1999, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10), 4407-4414

- [60] F. A. Macas, J. C. G. Galindo, D. Castellano, R. F. Velasco., 2000, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (11), 5288-5296.
- [61] F. M. Raupp, O. Spring., 2013, *J. Agr. Food Chem.*, 61 (44), 10481-10487.
- [62] GIORDANO, O. S., PESTCHANKLR, M. J., GURREIRO, E., SAAD, J. R., ENRIZ, R. D., RODRIGUEZ, A. M., JAUREGUI, E. A., GUZMAN, J., MARIA, A. O. and WENDEL, G. H. (1992), Structure-Activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several Sesquiterpene lactones, *J. Med. Chem.*, **35**, 2452-2458.
- [63] H. J. Bouwneester, R. Matusova, S. Zhongkui, M. H. Beale., 2003, *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 358-364.
- [64] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff., 2013, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 12780-12805.
- [65] F. D. F. Favero, R. Grando, F. R. Nonato, I. M. Sousa, N. C. Queiroz, G. B. Longato, R. RT.
- [66] LONERGAN, G., ROUTIS, E., GEORGIADIS, T., AGELIS, G., HONDRELIS, J., MATSOUKAS, J., LARSEN, L. K., CAPLAN, F. R. (1992), *J. Nat. Prod.*, 55, 225.
- [67] Elhazimi.H. *Natural product*, (1995) 149-190.
- [68] NOVAK, G. (1993), *J. Chromatographia*, **35**, 325.
- [69] Daniel S. Domin *Journal of Chemical Education* Décembre 92 ,p 877 et 978
- [70] RAMOS, A., RIVERO, R., VISOZO, A., PILOTO, J., GARCIA, A.(2002), *Muta Res*, **514**, 19.
- [71] : Professeur Jean-Louis Cuq. *Cours chromatographie liquide*, Université Montpellier (2001), p4
- [72] B, Latifa. Étude de la séparation des fluoroquinolones par hplc: application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma. Mastère en chimie analytique, Université Tunis El Manar
- [73] Harborne, J. B. (1975). *Flavonoides in phytochemistry*, vol. II, Edition Lawrence, P.L., Vol. II, Litton Educational publishing.
- [74] Drozd, B. (1967), *Driss. Pharmac. Pharmacol*, 19, 223
- [75] Drozd, B. (1967) , *Driss. Pharmac. Pharmacol*, 20, 223
- [76] Mac Lafferty. (1980), *interpretation of mass spectra*, 3rd edition,.
- [77] Wilson, R.G.,Bowie, J.H. et Williams, D.H.(1986). *Tetrahydron*, 24, 1407.
- [78] Nielsen, J. G and Moller J. (1970). *Acta Chem. Scand.*, 24,2665.
- [79][https://www.researchgate.net/publication/260837635\\_a-Methylene-g-lactones\\_as\\_a\\_Novel\\_Class\\_of\\_Anti-leukemic\\_Agents](https://www.researchgate.net/publication/260837635_a-Methylene-g-lactones_as_a_Novel_Class_of_Anti-leukemic_Agents)
- [80] B. Hanene, investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Paviflora* DESF, Magister, université Mentouri.

- [81] Nauciel. C., and Vildé J.L., 2005. Bactériologie médicale. 2èmeEd. Masson, Paris. P: 5,10.
- [82] Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Ed Masson, Paris, 486 p
- [83] Singh SB., Barrett JF., 2006. Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015.
- [84] B. Patrick, L. Jean, S. Michel. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. *1<sup>er</sup> Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. 1988*, pp100-108-274.
- [85] P. Steven, C. Rachel, E. Martha, H. Paul, S. Jane, W.J. Peter. Microbiology of Waterborne Diseases. *Ed Elsevier Academic Press. 2004*, pp71-132

## Résumé

Dans le cadre de notre étude des plantes médicinales, nous avons réalisé une étude phytochimique et biologique dans la plante *Marrubium vulgare* qui appartient à la famille lamiacées.

L'extraction des sesquiterpènes lactone a été effectuée par macération hydroalcoolique puis décantation par différent solvant organique.

D'après les couleurs des taches, l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) montre que cette espèce est riche en sesquiterpènes lactone.

L'étude antibactérienne a montré que l'extrait chloroformique possèdent agissent différemment sur les espèces bactériennes testées.

## ملخص

كجزء من دراستنا للنباتات الطبية ، أجرينا دراسة نباتية كيميائية وبيولوجية في نبات الفراسيون الشائع الذي ينتمي إلى العائلة الشفوية. تم إجراء عملية استخلاص السيسكويتربينات الالكترونية بواسطة النقع المائي الكحولي ثم بواسطة مذيبات عضوية مختلفة. وفقا للون البقع ، فإن التحليل اللوني بواسطة الطبقة الرقيقة (TLC) يدل على أن هذا النوع غني بالسيسكويتربينات الالكترونية. أظهرت الدراسة المضادة للجراثيم أن مستخلص الكلوروفورم له تأثيرات مختلفة على الأنواع البكتيرية المختبرة.

## Abstract

As part of our study of medicinal plants, we conducted a phytochemical and biological study in the plant *Marrubium vulgare* which belongs to the lamiaceae family.

The extraction of sesquiterpenes lactone was carried out by hydroalcoholic maceration and then decantation by different organic solvent. From the stain colors, thin layer chromatography (TLC) analysis shows that this species is rich in lactone sesquiterpenes.

The antibacterial study showed that the chloroform extract possess different effects on the bacterial species tested.