

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET BOPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة محمد بوقرة بومرداس
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA –BOUMERDES



Faculté des sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Science Biologique

Spécialité : Biologie des Populations et des Organismes

THÈME

Evaluation des activités biologiques des extraits d'une Asteraceae

Présenté par

M^{elle}. AKLIL Asmaa

M^{elle}. BANDOUC Amina

Soutenue le 20 / 06 / 2017 devant le jury :

ARAB Karim.	Professeur (F.S/UMBB)	Président
ROUANE Asma.	M.A.B (F.S/UMBB)	Promotrice
FOUDIA Soumaya.	M.A.B (F.S/UMBB)	Examinatrice

2016- 2017

Remerciements

Avant tout, nous remercions le bon Dieu qui nous a éclairé le chemin et nous a donné la patience et le courage pour réaliser ce travail

Nous plus vifs remercions à notre chère promotrice Madame ROUANE Asmaa maître assistant à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes de nous avoir fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su nous guider avec patience, compréhension et rigueur. Nous lui enserai toujours reconnaissante.

Nos remerciements vont également à

Monsieur Pr. ARAB Karim de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury, et pour votre disponibilité régulière au niveau de laboratoire de biologie des populations et des organismes et vos encouragements.

L'honorable membre de jury Mme. Foudia soumaya d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

Nous remercions également monsieur M. Nabiev professeur au sein de département de génie des procédés chimiques et pharmaceutiques pour ses précieux conseils sa disponibilité et sa gentillesse, qu'il nous ouvre son laboratoire 'laboratoire de traitement des eaux et extraction des substances biologiques' pour la réalisation de l'extraction assistée par micro-ondes des huiles essentielles.

Madame MIZALI Samira nous remercions pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos encouragements et surtout pour son aide et tous ses précieux conseils pour la réalisation de dosage spectroscopique infra rouge.

Nous remercions également tous les membres de laboratoire de biologie des populations et des organismes qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail.

Tous nos collègues avec qui nous avons entretenus une ambiance chaleureuse et adorable moments

Nos vifs remercions vont à nos très chers parents pour leur aide, patience, soutien moral et encouragement

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

A mes parents,

Sans vous je ne serais pas là,

*Pour tout votre amour et votre soutien, si précieux, pendant toutes ces années, et encore
aujourd'hui, et encore demain, je le sais.. !*

Pour l'enfance merveilleuse que vous m'avez offerte et à laquelle il me manquait rien.

Comment vous dire merci...

Avec tout mon amour.

A Ryad, Imen, Ranya et Bilal

Mes frères sœurs adorés, mes amies, mes confidents,

*Parce que c'est avec vous que je me sens complète, parce que vous me faites rire (ou pas
d'ailleurs..), parce que je peux tout vous dire, pour ces millions de souvenirs où vous êtes là,
toujours présentes à mes côtés, et pour ceux à venir. Je serai toujours là pour vous ! Ne*

partez pas trop loin de moi,

Je ne vous le dis pas assez, je vous aime !

A ma famille

A ma grande mère

A mes oncles et mes tantes

A chaque cousins et cousines.

Pour votre présence à mes côtés, votre soutien au cours de mes études, Merci

A Bouda Amina

*Ma sœur de cœur qu'a toujours cru en moi, Parce que tu me redonner confiance lorsque la
motivation n'était plus au rendez-vous, Je serai toujours là pour toi.*

A Bandou Amina

Mon binôme pour ton esprit de collaboration, tes encouragements et tes efforts

Pour les moments difficiles et agréables qu'ont été ensemble ainsi à sa famille

A tous mes collègues de la promo BPO 2017

A qui j'ai partagé la paillasse

Très particulièrement a bouchera

A mes proches ami(e)s

Qui m'ont toujours soutenue et encouragée.

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A tous ceux qui me sont chères

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Aklil Asmaa ^_^

Dédicace

A mes chers parents :

Vous êtes ma fierté, vous vous êtes dépensés pour moi sans compte, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte .Ce modeste travail est en partie le fruit de votre soutien et encouragement ; je vous suis très reconnaissante.

Que dieu vous protège.

A mes chères sœurs Salima et Amel :

Vous êtes mes exemples, vous avez toujours été présente pendant tout mon parcours avec vos bons conseils et votre soutien moral.

A mes chers frères Samir, Noureddine et Hamada :

Pour votre appui et votre encouragement,

A mes belles sœurs Radia et Ryma, mon beau-frère Mourad et les petits "bouts de chou" du bonheur : Doudou, Mary, Assissal, Ayoubi ,Yassor, Annos et Amany.

A mes grands pères Ahmad et Omar et mes grandes mères Meriame et Houria.

A mes cousines Sarah, Souhila, Warda et Hayate.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

A ma chère amie Ikram :

Pour ton soutien moral, ta présence et tes encouragements

A ma binôme Asmaa et sa famille :

En témoignage de l'amitié qui nous unit et les souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble. Merci pour ta patience et ta gentillesse.

A toute la section de Biologie des Organismes et de Population promotion 2016-2017.

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.

Amina 

SOMMAIRE

	Page
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	
I.1 Généralité sur <i>Inula viscosa</i>	03
<hr/>	
I.1.1 Taxonomie	03
I.1.2 Répartition géographique	03
I.1.3. Description botanique	03
I.1.4. Parties utilisées	04
I.1.5. Aspect pharmacologique	05
I.1.6. Aspect phytochimique	05
I.2 Métabolites des plantes	06
<hr/>	
I.2.1. Métabolites primaires	06
I.2.2. Métabolites secondaires	06
I.2.2.1. Huiles essentielles	06
Composition chimique des HE	07
Procédés d'extraction des Huiles essentielles "HE"	08
I.2.2.2 Composés phénoliques	10
I.2.2.2.1. Principales classes des polyphénols	10
I.2.2.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques	11
voie de shikimate	12
voie des phénylpropanoïdes	13
I.2.2.2. 3. Procédés d'extraction des Composés phénoliques	14
I.2.2.3. Flavonoïdes	14
I.2.2.3.1. Classification des flavonoïdes	14
I.2.2.3.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes	15
I.2.2.3.3. Biosynthèse des flavonoïdes	15
I.2.2.3.4. Procédés d'extraction des Flavonoïdes	15
I.3. Activités biologiques	16
<hr/>	
I.3.1. Activité antioxydant	16
I.3.1.1. Mécanisme d'action	16
I.3.1.2. Méthodes d'étude de l'activité antioxydante	17
Test de piégeage du radical DPPH	17
Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxidant power)	17
Test de blanchissement du β - carotène	17
I.3.2. Activité antibactérienne	18
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
II.1 Matériel utilisés	20
<hr/>	
II.1.1. Matériel végétal	20
II.1.1.1. Position géographique des zones d'étude	21
II.1.1.2. Récolte et Séchage	21
II.1.1.3. Préparation de la poudre fine	22
II.1.2. Matériel microbien	22
II.1.3. Matériel non biologique	23

II.2. Méthodes expérimentales	
II.2.1. Humidité relative (Teneur en eau)	23
II.2.2. Etude anatomique	25
II.2.2.1. Principe	25
II.2.2.2. Mode opératoire	25
II.2.2.3. Réalisation des coupes transversale	25
II.2.2.4. Double coloration Vert de Méthyle/ Rouge Congo	25
II.2.2.5. Sélection des coupes	26
II.2.2.6. Observations microscopique	26
II.3. Etude chimique	27
II.3.1. Préparation des extraits aqueux	27
II.3.2. Préparation de l'extrait brut hydro-méthoolique d' <i>I. viscosa</i>	27
II.4. Caractérisation chimique d'<i>Inula viscosa</i>	28
II.4.1. Testes phytochimiques	28
principe	28
Mode opératoire	28
II.4.2. Extraction d'huiles essentielles	29
II.4.2.1. Hydrodistillation type Clevenger	29
II.4.2.2. Hydrodistillation par micro-ondes assisté	30
II.4.3 Analyse quantitative des extraits	31
II.4.3.1. Dosage des polyphénols totaux	31
II.4.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	32
II.4.4. Analyse qualitative des extraits par Spectroscopie infrarouge	32
II.5. Activités biologiques	33
II.5.1. Activité antioxydant	33
II.5.1.1. Test de DPPH	33
III.5.1.1.1. Principe	33
III. 5.1.1.2. Préparation de la solution méthanolique de DPPH	34
III. 5.1.1.3. Préparation des extraits	34
III. 5.1.1.4. Mode opératoire	34
II. 5.1.2. Activité antibactérienne	35
Origines des souches microbiennes testées	35
Identification et conservation des cultures microbiennes	35
Etude de l'activité antibactérienne des extraits d' <i>Inula viscosa</i>	35
Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne	36
principe	36
Mode opératoire	36
III.2.1. Préparation de pré-culture bactérienne	36
III.2.2. Revivification des souches bactériennes	36
III.2.3. Préparation de la suspension bactérienne inoculum	37
III.2.4. Ensemencement	37
III.2.5. Préparation des disques	37
III.2.6. Test de sensibilité à l'antibiotique	37
Chapitre III : Résultats et discussions	
III. 1. Résultats	
III.1.1. Humidité relative (Teneur en eau)	39
III.2. Étude Anatomique	40
Tissu de revêtement	40
Tissu de remplissage	41

Tissu de soutien	41
Tissu conducteur	41
Tissus conducteur primaire	41
III.2.1. Anatomie de tige	42
III.2.1.1. Ecorce	42
III.2.1.2. Cylindre centrale	42
III.2.2. Anatomie de la feuille	44
I.2.2.1. Nervure centrale	44
I.2.2.2. limbe	44
III.2.3. Anatomie de la racine	46
III.2.3.1. Ecorce	46
III.2.3.2. Cylindre central	46
III.3. Études phytochimique	48
Interprétation des résultats	48
III.3.1. Extrait aqueuse de la partie aérienne fraîche 5%	49
III.3.2. Extraite aqueuse de la partie aérienne sèche (poudre)	49
III.3.3. Extrait aqueuse de la racine 5%	49
III.4. Rendement et caractérisation des extraits	49
III.4. 1.Rendement en HE	49
III.4. .2. Rendement en polyphénols totaux	50
III. 4. 3. Résultats de l'analyse quantitative	51
III.4.4. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	51
III.4.1.1. Evaluation de la teneur des polyphénols totaux	51
III.4.1.2. Evaluation de la teneur des flavonoïdes	3
III.4.5. Résultats d'analyse chimique des extraits par Spectroscopie infrarouge	55
III.4.1.1. Interprétation	61
III.4.1.2. Analyses spectrale	62
III. 5. Activités biologiques	
III.5.1. Activité antioxydant	63
Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait brut	63
III.5.2. Activité antibactérien	65
III.5.2.1. Antibiogramme	65
III.5.2.1.1. Extrait hydro alcoolique fraîche 5%	65
Test de sensibilité	65
Interprétation des résultats	66
III.5.2.1.2. Extrait brut de la partie aérienne en poudre (à 25%)	66
Test de sensibilité	66
Interprétation des résultats	66
Interprétation des résultats	67
III.5.2.2. Antibiogramme	67
Qualification de l'action antibactérienne des extraits étudiés	68
III. 6 Discussions	
III.6.1. Teneur en humidité relative (en eau)	70
III.6.2. Test phytochimique	70
III.6.3. Huile essentielle	70
III.6.4. Rendement en polyphénols totaux	70
III.6.5. Discussion de l'analyse quantitative	71
III.6.5.1. Discussion de dosage de polyphénol	71

III.6.5.2. Discussion de dosage des flavonoïdes	71
III.6.6. Activités biologiques	72
III.6.6.1. Antioxydant	72
III.6.6.2. Antibactérienne	72
<hr/>	
Conclusion	74
Références bibliographiques	76
Annexes	

Liste des abréviations

% : pourcentage

AFNOR: Association Française de Normalisation taxonomique intégré

ATB : antibiotiques

β -crotène : bêta-carotène

°C : degré Celsius

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DO : Densité optique

DPP/H : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EQ : Equivalent de quercétine

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power

GN : Gélose nutritive

HE: huiles essentielles

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IC50 : Concentration nécessaire pour atteindre une disparition de 50% de DPPH

IR : Infrarouge

mg/g : milligramme par gramme.

MH : Mueller Hinton

mm : millimètre

MS : matière sèche.

R : rendement.

RMN : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.

SITI : système d'information

μ l: Microlitre.

μ g : Microgramme

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
Tableau 1	taxonomie d' <i>Inula viscosa</i> d'après Fournier (1947)	3
Tableau 2	actions pharmacologiques et thérapeutique d' <i>Inula viscosa</i>	5
Tableau 3	germe responsable des infections urinaires	18
Tableau 4	caractérisations des deux régions de récolte	21
Tableau 5	liste des souches bactériennes testées	22
Tableau 6	molécules recherchées, leurs réactifs de caractérisation et les résultats attendus (Harborne, 1998 ; Trease et Evans, 1989)	28
Tableau 7	principales caractères des souches bactériennes testées selon Fauchère et Avril (2002).	35
Tableau 8	différentes concentrations d'extrait brut SM et de macérat hydro-alcoolique	36
Tableau 9	résultats des tests de caractérisation photochimique	48
Tableau 10	résultats des tests de caractérisation photochimique	48
Tableau 11	rendement et propriétés organoleptiques de l'HE d' <i>Inula viscosa</i>	50
Tableau 12	rendement d'extraction et propriétés organoleptiques des extraits aqueux et hydro-méthanolique d' <i>Inula viscosa</i> des deux régions.	50
Tableau 13	teneur en polyphénols totaux de l' <i>Inula viscosa</i> dans les extraits (mg EAG/g)	52
Tableau 14	teneur en flavonoïdes de l' <i>Inula viscosa</i> dans les extraits (mg EAG/g)	53
Tableau 15	illustration des liaisons chimiques de l'infusé de la partie aérienne fraîche d' <i>I. viscosa</i>	55
Tableau 16	illustration des liaisons chimiques de Décocte de la partie aérienne fraîche d' <i>I. viscosa</i>	56
Tableau 17	illustration des liaisons chimiques de infusée des racines d' <i>I. viscosa</i>	57
Tableau 18	illustration des liaisons chimiques de décocté des racines d' <i>I. viscosa</i>	58
Tableau 19	illustration des liaisons chimiques de infusé de la partie aérienne poudre d' <i>I. viscosa</i>	58
Tableau 20	illustration des liaisons chimiques de décocté de la partie aérienne (en poudre) d' <i>I. viscosa</i>	59
Tableau 21	illustration des liaisons chimiques d'extrait brut méthanolique de la partie aérienne poudre d' <i>I. viscosa</i>	60

Tableau 22	illustration des liaisons chimiques d'huile essentielle d' <i>I. viscosa</i>	61
Tableau 23	valeurs d'IC50 des extraits bruts et d'acide ascorbique.	63
Tableau 24	diamètre des zones d'inhibition (mm) de macéra hydro alcoolique 5% de la partie aérienne fraîche d' <i>Inula viscosa</i> des deux régions sur la croissance des souches testées.	65
Tableau 25	diamètre des zones d'inhibition (mm) des dilutions d'extrait brut 25% d' <i>Inula viscosa</i> des deux régions sur la croissance des souches testées.	66
Tableau 26	diamètre des zones d'inhibition (mm) des antibiotiques sur les croissances des souches testées.	67

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Figure 1	aspect morphologique d' <i>Inula viscosa</i> (Berhail, 2014)	4
Figure 2	montage d'hydrodistillation (Bachelot <i>et al.</i> , 2006).	8
Figure 3	entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Marie, 2005).	9
Figure 4	schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.	10
Figure 5	principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).	10
Figure 6	principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)	11
Figure 7	principaux types de coumarines (Macheix <i>et al.</i> , 2005)	11
Figure 8	biosynthèse des composés phénoliques (Mohammedi, 2013).	12
Figure 9	Squelette de base des flavonoides (Dean, 1963)	14
Figure 10	régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).	16
Figure 11	schéma des vois urinaires (Boutoille, 2011 ; Merck ,2008)	19
Figure 12	partie aérienne et souterraine d' <i>I. viscosa</i> (original, février 2017).	20
Figure 13	Carte géographique des deux régions d'étude	21
Figure 14	partie aérienne d' <i>Inula viscosa</i> sèche sur papier journal (Original, février 2017)	22
Figure 15	poudre fine d' <i>Inula viscosa</i> (Original, février 2017)	22
Figure 16	schéma de plan de travail	24
Figure 17	étapes de la double coloration vert de méthyl - rouge congoo	26
Figure 18	montage d'hydrodistillation type clevenger employé pour l'extraction de l'huile essentielle (PAVIDA <i>et al.</i> ,1976).	29
Figure 19	montage d'hydrodistillation sous micro-ondes employé pour l'extraction de l'huile essentielle	31
Figure 20	structure chimique du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici <i>et al.</i> , 2009).	33
Figure 21	réaction de test DPPH (2.2 Diphenylpicrylhydrazyl) (Congo, 2012).	33
Figure 22	schéma général du protocole expérimental de l'activité antibactérien	38
Figure 23	Humidité relative et matière sec d' <i>Inula viscosa</i> des deux régions	39
Figure 24	aspect anatomique de la tige d' <i>Inula viscosa</i> au Microscope photonique (original, 2017)	43

Figure 25	aspect anatomique de la feuille d' <i>I. viscosa</i> au microscoupe photonique G *40 (original, 2017)	45
Figure 26	aspect anatomique de la racine d' <i>Inula viscosa</i> observé au MP G* 40 (original, 2017)	47
Figure 27	droite d'étalonnage des polyphenol totaux (Benhbillesse,)	51
Figure 28	teneurs en polyphénols totaux de l' <i>Inula viscosa</i> dans les extraits (mg EAG/g)	52
Figure 29	droite d'étalonnage des flavonoïdes (moyenne ± SD de trois mesures) (Yakhlef, 2010).	53
Figure 30	teneur en flavonoïdes de l' <i>Inula viscosa</i> dans les extraits (mg EQ/g)	54
Figure 31	spectre infra rouge de l'infusé de la partie aérienne fraîche d' <i>I. viscosa</i>	55
Figure 32	spectre infra rouge de Décocte de la partie aérienne fraîche d' <i>I. viscosa</i>	56
Figure 33	spectre infra rouge de infusée des racines d' <i>I. viscosa</i>	57
Figure 34	spectre infra rouge de décocté des racines d' <i>I. viscosa</i> .	57
Figure 35	spectre infra rouge chimiques de infusé de la partie aérienne poudre d' <i>I. viscosa</i>	58
Figure 36	spectre infra rouge de décocté de la partie aérienne poudre d' <i>I. viscosa</i>	59
Figure 37	spectre infra rouge d'extrait brut hydro-méthanolique de la partie aérienne (en poudre) d' <i>I. viscosa</i>	60
Figure 38	spectre infra rouge d'huile essentielle d' <i>I. viscosa</i> .	61
Figure 39	concentration (IC ₅₀) d'extrait brut d' <i>Inula viscosa</i> des deux régions et d'acide ascorbique qui inhibent 50 % du radical	63
Figure 40	pourcentage d'inhibition des radicaux libres (A) courbe étalon d'acide ascorbique; (B) pourcentage d'inhibition de l'extrait brut de la région de Hammedi ; (C) pourcentage d'inhibition de l'extrait brut de la région de Benyounes	64
Figure 41	Illustration des résultats de l'antibiogramme	68
Figure 42	développement des colonies prélevé à partir de la zone d'inhibition d'extrait hydro alcoolique 5%	68
Figure 43	développement des colonies prélevé à partir de la zone d'inhibition d'extrait brut 25%	69

Liste d'annexe

Annexe 1	Structure chimique de quelque composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)
Annexe 2	Biosynthèse des flavonoides (Bruneton 1999)
Annexe 3	Schéma récapitulatif de protocole des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoides.
Annexe 4	Matériel non biologique
Annexe 5	Résultats de test phytochimique de la partie aérienne fraîche 5%
Annexe 6	Résultats de test phytochimique de la racine 5%
Annexe 7	Résultats de test phytochimique de la partie aérienne à 5% (sèche réduit en poudre)
Annexe 8	Résultats de test phytochimique de la poudre
Annexe 9	Résultats des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait hydro alcoolique 5%
Annexe 10	Résultats des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait brut 25%
Annexe 11	Résultat d'antibiogramme de l'extrait hydro-alcoolique (macérat à 5% de la partie aérienne fraîche)
Annexe 12	Résultat d'antibiogramme de l'extrait brut à 25%

Introduction

Introduction

Au cours des siècles, très nombreuses plantes spontanées sont utilisées par la majorité des habitants du globe terrestre, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme remède en médecine traditionnelle. Cette utilisation tient compte simplement des observations ceci nécessite la caractérisation de ces critères scientifiques. Ces plantes fournissant des métabolites primaires en quantités élevées et secondaires en faible quantités mais en plus grande importance (Lucchesi, 2005).

Actuellement ces molécules bioactives issues des végétaux suscitent un intérêt tout particulier par leurs multiples activités biologiques (antibactérienne, antioxydant et insecticides). C'est ainsi que, l'homme exploite ces métabolites pour un rôle bénéfique, dans un large éventail d'application (la santé humaine et de l'industrie alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique). (Bahorun *et al.*, 1996). Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, largement utilisés dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (Anderson *et al.*, 1996).

Les composés phénoliques sont appelés aussi les polyphénols, font l'objet de nombreuses recherches. Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme inhibiteurs enzymatique, antioxydants et anti radicalaires (El-demerdash *et al.*, 2005)

En outre, la protection de la santé humaine s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure grâce à la lutte biologique par les substances naturelles d'origine végétale. Les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux agents antioxydant, antibactérienne et insecticides (Tietze *et al.*, 2000).

Nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des, procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Ainsi que, les biologistes et les chimistes reconnaissent bien l'importance majeure de ces biomolécules et leurs méthodes d'extraction (Clardy et Walsh, 2004)..

La maîtrise des infections bactériennes deviens complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Benbrinis, 2012).

L'Algérie, possède une position géographique particulière lui accordant une large bande de végétation très variée notamment les plantes aromatiques médicinales, dont la phytothérapie est une pratique très ancienne dans ce pays. Il dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (Gaussen, 1982).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, on s'est intéressé aux espèces de la famille des Astéracées *Inula viscosa*, une plante abondante choisie de cette biomasse végétale en raison du bénéfice des propriétés thérapeutiques que lui a attribuées la médecine traditionnelle.

Ce travail est développé dans 4 chapitres suivants;

- ◆ **Le premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique sur :
 - ✓ la plante d'étude et un aperçu sur les métabolites des végétaux: les huiles essentielles, les composés phénoliques et les flavonoïdes et leurs effets biologiques et leurs méthodes d'extraction;
 - ✓ les insectes et leurs dommages;
 - ✓ l'usage biologique et autres.
 - ✓ Aperçu sur les activités biologiques: antioxydante et insecticide
- ◆ **Le deuxième chapitre** aborde le matériel et les méthodes utilisés. Il est consacré à une étude expérimentale, sur :
 - ✓ l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation;
 - ✓ Évaluation de l'activité antioxydante et insecticide des extraits de la plante et d'huiles essentielles.
- ◆ **Le troisième chapitre** est consacré à la présentation des résultats obtenus qui seront interprétés et discutés, et on finalise ce travail par une conclusion générale et perspectives.

Chapitre I

Synthèse bibliographiques

 **I.1. Généralité sur *Inula viscosa***

Depuis l'antiquité, l'histoire thérapeutique de cette plante est très diversifiée et connue; elle a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle et sous plusieurs formes. Plusieurs recherches phytochimiques et biologiques ont été réalisées (Susplugas, 1980).



I.1.1. Taxonomie

Inula viscosa, est une nomenclature viendrait du grec (**Bruneton, 1993**), dont *Inula* viendrait d'Inéo qui signifie "je purge"(Allusion à une propriété thérapeutique de la plante) (Fauron et Moati 1983) et *viscosa* : visqueuse (Fournier 1947).

Sa taxonomie est configurée dans le tableau 1

Tableau 1: taxonomie d'*Inula viscosa* d'après Fournier (1947)

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous Classe	Gamopetales
Ordre	Campunulales
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>viscosa</i> - L – ait
Synonymie	<i>Dittrichia viscosa</i> L
Nom commun	Inule, Aunée Visqueuse
Noms vernaculaires	Magramane Ou Amagramane. (Quezel et Santa, 1963), (En Afrique du nord)
Est d'Algérie / Kabylie	
Arabe littéraire	El-Tayoune
France	Anacycle de valence (Léger, 2007)
Italie	Camomilla de Valencia (Léger, 2007)
Espagne	Manzanilla corda (Léger, 2007)

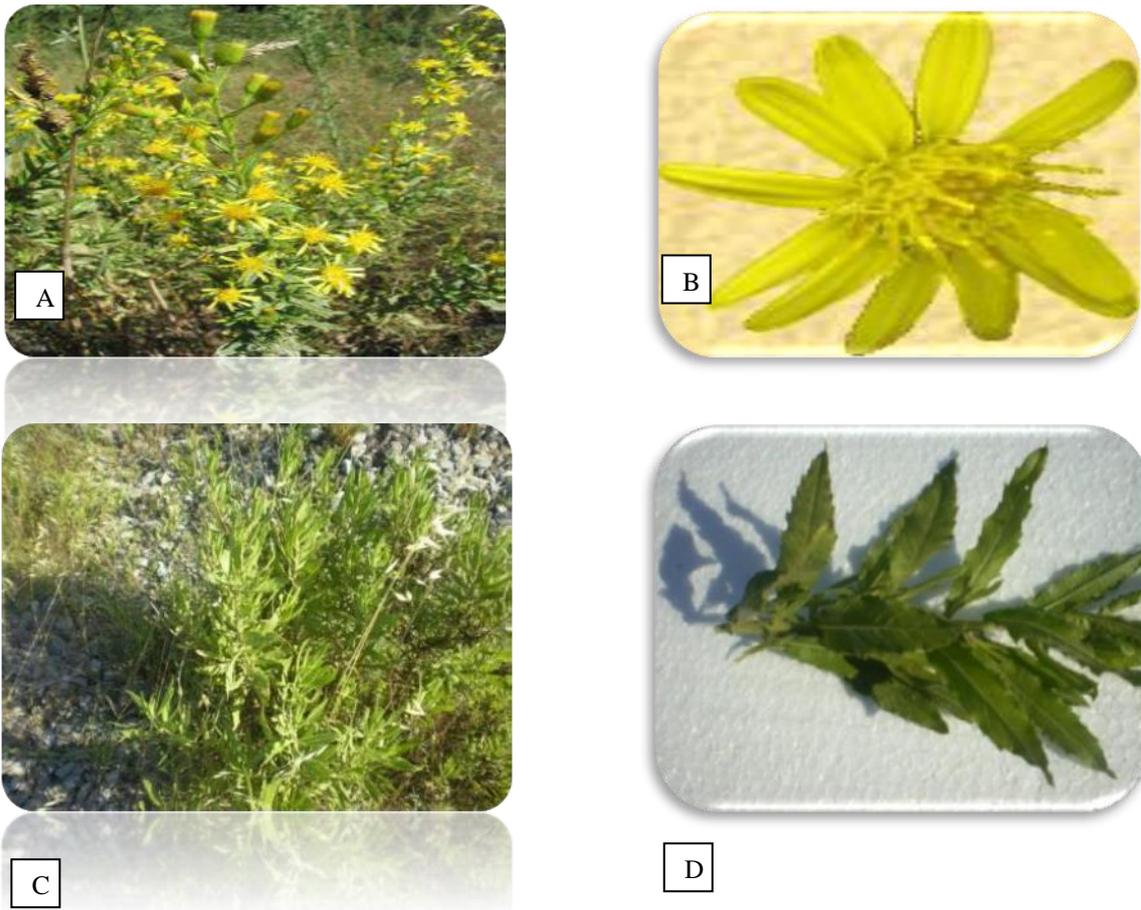
I.1.2. Répartition géographique

L'inule est une plante des régions méditerranéennes, présente sur des sols salés, des prairies humides et des bords de cours d'eau (Quezel et Santa 1963). Elle est largement répandue en Algérie dans les rocailles et les terrains argileux (Benayache, 1991). Elle fleurit à la fin de l'été et au début de l'automne.

I.1.3. Description botanique

Quezel et Santa (1963) rapportent que l'inule est une plante herbacée annuelle, par contre la plupart des auteurs disent qu'elle est herbacée pérenne grâce aux branches ligneuses qui

bourgeonnent à chaque printemps. Elle apparaît sous forme de buissons de 0.5 à 1m de hauteur, ligneuse dans sa partie inférieure avec des feuilles sessiles, ondulées, dentées, aiguës, rudes recouvertes sur les deux faces de glandes visqueuses qui dégagent pendant la phase végétative une odeur agréable et âcre mais par certains désagréable. La floraison apparaitre à partir du mois de Septembre-octobre selon les lieux. Les inflorescences sont de longues grappes fournies de capitules jaunes avec des fleurs périphériques liguliformes, celles du centre sont tubulaires. Les fruits sont des akènes velus à aigrette grisâtre.



(A) arbuste pendant la période de florescence, (B) capitule, (C) aspect générale de la plante, (D) les feuilles

Figure 1 : aspect morphologique d'*Inula viscosa* (Berhail, 2014)

I.1.4. Parties utilisées

Généralement, c'est la partie aérienne de la plante (feuilles et tiges) sèches et réduites en poudre ou bien des feuilles fraîches (Ulubelen 1987- Cafarchia et al, 1999) qui sont utilisées dans la préparation traditionnelle des traitements. Mais aussi la partie souterrain (les racines) est peut être utilisé pour l'extraction d'inuline et l'hélénine ou camphre d'Aunée (Fournier 1947).

I.1.5. Aspects pharmacologiques

L’Inule, a été utilisée au moyen âge à nos jours pour ses vertus médicinales variées (Fournier 1947) voir le tableau 2 suivant.

Tableau 2:: actions pharmacologiques et thérapeutique d'*inula viscosa*

Maladie	Partie utilisé	Mode utilisé/ principe actif	Organe ciblé	Auteurs
Bronchite, Asthme, antiseptique	Feuilles fraîches	Tisanes	Appareil respiratoire	Benayache Dendoughi Jay 1991
Aigreurs d'estomac/Corrige l'atonie de l'intestin. Amélioration de l'appétit Antiémétique	Feuilles et racines sèches (poudre)	Tisanes	Estomac et intestin	Roulier, 1990
Antiseptique, Diurétique, Traitement des leucorrhées	Feuilles fraîches	Tisanes	Appareil génital -voies urinaires	Fournier 1947
Mycoses cutanées Démangeaisons	Feuilles et racines sèches (poudre)	Pommade	La peau	Ulubelen 1987- Taillade et al 1980
diabète / hypoglycémiant	Feuilles sèches	Tisanes	Pancréas	Yaniz 1987
Le paludisme/ antipyrétique	Feuilles fraîches ou séchées	Tisane ou en bains	La tête Tube digestif	Fournier 1947
brulures et plaies / synthèse de callogène et la réparation tissulaire	Feuilles fraîches	Pommade	La peau	Chari et Hamdi Pacha 1999
balsamiques, antipyrétiques, antiphlogistiques et antiseptiques	Feuilles (fraîches et sèches) Racines sèches	Tisanes Pommade	Le corps humain	Lauro et Rolih1990
Le spasme / inhibition de l'action de la l'Acetylcholine	Feuilles séchées (poudre)	Tisane	fibres lisses intestinales et bronchiques	Abdellah et al 1988
Antinulcérogénique		Flavonoïdes		Alarcon, 1993
Antifongique -Inhibition de la synthèse d'ergostérol et de la chitine	plante entière, feuilles et fleurs, plante entière sans fleurs	Flavonoïdeset HE -HE	dermatophytes -paroi des dermatophytes	Cafarchia, 2002, Adam, 1998 Bssaibis, 2009

I.1.6. Aspects phytochimiques

La partie aérienne d'*Inula viscosa* contient des Flavonoïdes, des acides sesquiterpéniques et des triterpènes esters, tandis que la racine contient de l'Inuline, l'héliénine ou camphre d'Aunée (Benayache et al.,1991; Fournier,1947), de la paraffine et 3 sesquiterpènes essentiels : l'Alantole, l'Alantolactone et l'Acide Allantique (Ulubelen et Goun 1986- Chiarlo 1988). Elle possède d'autres substances mineures comme: la résine et la pectine constituant une matière noire : la Phytomélanine (Oksuz, 1976).

I.2 Métabolites des plantes

Les métabolites des végétaux sont des molécules issues du métabolisme. On distingue deux classes principales : Métabolites primaires et secondaires. Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (Haslam, 1993).

I.2.1. Métabolites primaires

Ils ont un rôle essentielle pour la survie et le développement de la cellule de l'organisme (plantes) et possèdent une fonction intrinsèque, se retrouvent dans toutes les espèces (Cox, 1994). Ils sont :

- **Glucides (sucres et polysaccharides)** : source d'énergie, paroi cellulaire.
- **Lipides** : source d'énergie, membranes cellulaire.
- **Acides aminés** : construction des protéines.
- **Nucléosides, les acides nucléiques et leurs précurseurs biosynthétiques.**

I.2.2. Métabolites secondaires

Ces molécules sont plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons. Elles sont nombreuses, d'une variété structurale extraordinaire; elles ne sont pas nécessaires et vitales pour la cellule. Elles permettent parfois une taxonomie chimique, et sont souvent impliquées dans une écologie chimique inter-espèces. Enfin, ces molécules ont de nombreuses applications pharmaceutiques et sont définies en fonction de critères chimiques et biosynthétiques. Ils sont répartis en trois groupes majeurs :

- **Les Terpénoïdes** : dérivés de l'isopentényldiphosphate, peuvent être classés selon leur nombre d'unités isopréniques et leur nombre d'atomes de carbone (Bruneton, 1999).
- **Les Alcaloïdes**: dérivés des acides aminés généralement sont des composés azotés, 12000 composés connus (Seghiri, 2005).
- **Les Composés phénoliques** : formés par la voie shikimate et/ou acétate (malonate), 8000 composés connus (Bravo, 1998).

I.2.2.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (essences : huiles volatiles) sont des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (Bruneton, 1999).

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par solvant, par enfleurage, par expression ou par d'autres méthodes (Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999).

II.2.2.1.1. Composition chimique des HE

Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux groupes: le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques qui est beaucoup moins fréquents dérivés du phenylpropane. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils. Les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable (Bruneton, 1999).

✓ **Composés terpéniques**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Ils sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. L'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés (exp: **alcools** (linalol), **esters** (acétate de linalyle), **aldéhydes** (menthone, camphre, thuyone), les **cétones**, les **éthers**, les **phénols** et les **peroxydes**) (Paris et Hurabielle, 1981; Svoboda et Hampson, 1999).

Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (**C₅H₈**) (Wallach dès 1887 *in* Lamarti *et al.*, 1994). Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» (Ruzicka, 1953 *in* Lamarti *et al.*, 1994). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).

➤ **Monoterpènes C₁₀H₁₆**

Ces composés sont constitués de deux unités d'isoprène (Rahal, 2004) et peuvent être: monoterpènes **acycliques** (myrcène, ocimènes), mono terpènes **monocycliques** (α - et γ -terpinène, p-cymène) et aux mono terpènes **bicycliques** (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène) (voire Annexe N°1).

La réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols (Bruneton, 1999).

➤ **Sesquiterpènes C₁₅H₂₄**

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (Belaiche, 1979). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités (Rahal, 2004). Les sesquiterpènes peuvent être **acycliques** (farnésol), **monocycliques** (humulène, α -zingibèrene) ou **polycycliques** (matricine, artéannuine, β ,artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme **alcools** (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), **cétones** (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), **aldéhydes** (sinensals), **esters** (acétate de cédryle) (Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004).

✓ **Composés aromatiques dérivés du phenylpropane**

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3) qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (Paris et Hurabielle, 1981). Ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées mais aussi de celles du Girofle (eugénol); aussi y a des huiles essentielles en C6-C1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyle (Bruneton, 1999). Les lactones dérivées des cinnamiques (exemple: coumarines) étant, au moins pour les plus simple d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles.

✓ Composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Notamment, issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares.

D'autres produits extractibles par des solvants malgré importances de leurs masses moléculaires (homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc...) (Bruneton, 1999). Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène (l'indole dans l'HE de citron et des fleurs de jasmin).

I.2.2.1.2. Procédés d'extraction des Huiles essentielles "HE"

❖ Hydrodistillation

Cette méthode est normée pour l'extraction d'une huile essentielle (Afnor, 1992), ainsi que pour le contrôle de qualité (Pharmacopée Européenne, 1996). Elle consiste à distiller un mélange hétérogène "eau-produit naturel". L'extraction des HE se fait par l'éclatement des cellules qui contiennent les principes actifs recherchés par la chaleur. La vapeur d'eau transporte ces extraits jusqu'au condenseur qui refroidit le tout et fait de cette vapeur d'eau et de ces extraits un condensat liquide. Ce dernier comporte deux phases distinctes qui sont l'eau et l'huile essentielle (**Fig.2**).

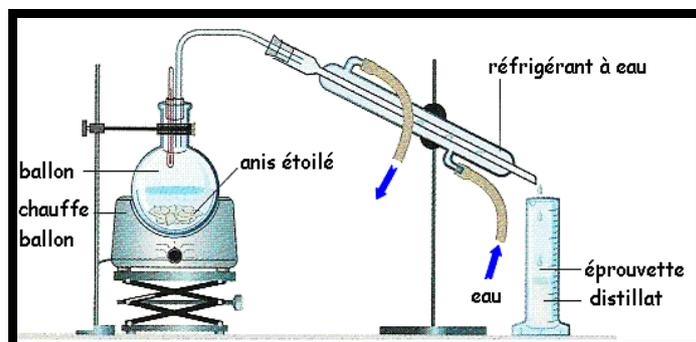


Figure 2 : montage d'hydrodistillation (Bachelot *et al.* , 2005).

❖ Entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique: l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Marie, 2005).

❖ Hydrodiffusion

L'extraction des HE se fait par contact indirect entre le matériel végétal et l'eau. Elle exploite l'action osmotique de la vapeur d'eau descendant grâce de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. De plus, elle permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Marie, 2005).

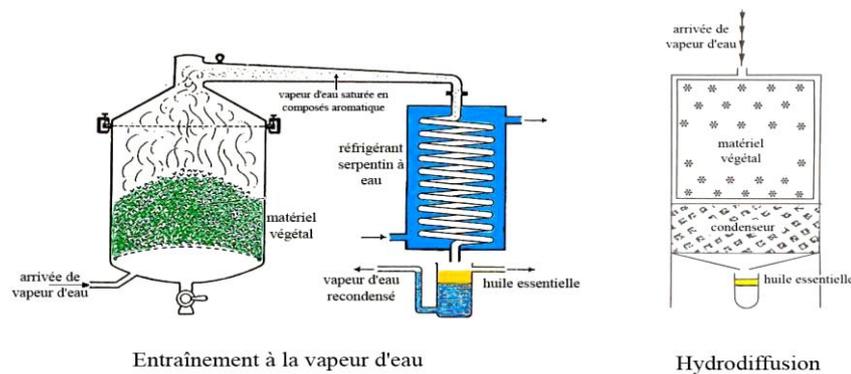


Figure 3 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Marie, 2005).

❖ Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Ce procédé consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes sur même principe de l'hydrodistillation classique. Le matériel végétal est placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes (Fig.4). Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique (Stashenko et al. ; 2004).

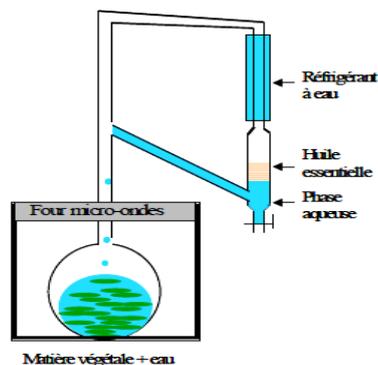


Figure 4 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.

I.2.2.2. Composés phénoliques

Caractérisant par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels peut être des molécules simples (acides phénoliques simples) ou des molécules plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel car elles peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et al. , 2005).

I.2.2.2.1. Principales classes des polyphénols

a. Acides phénoliques simples

✓ Acides hydroxycinnamiques (C6-C3).

Dérivent de l'acide cinnamique, ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Figure 5).

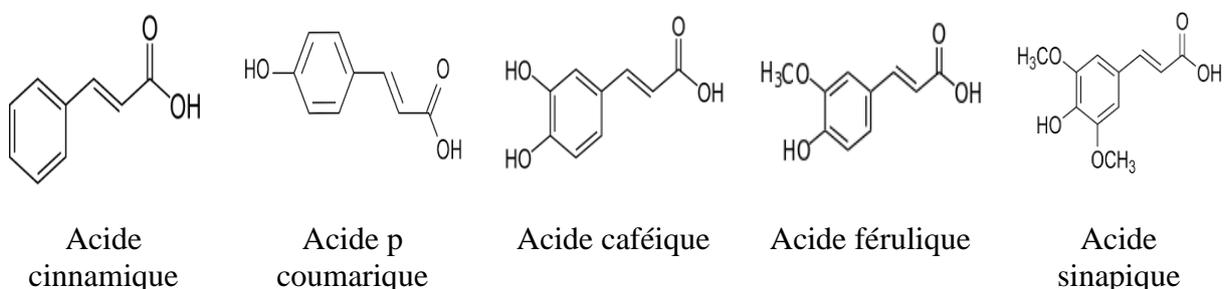


Figure 5 : principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

✓ Acides hydroxybenzoïques (C6-C1).

Sont des dérivés de l'acide benzoïque, Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la figure (6).

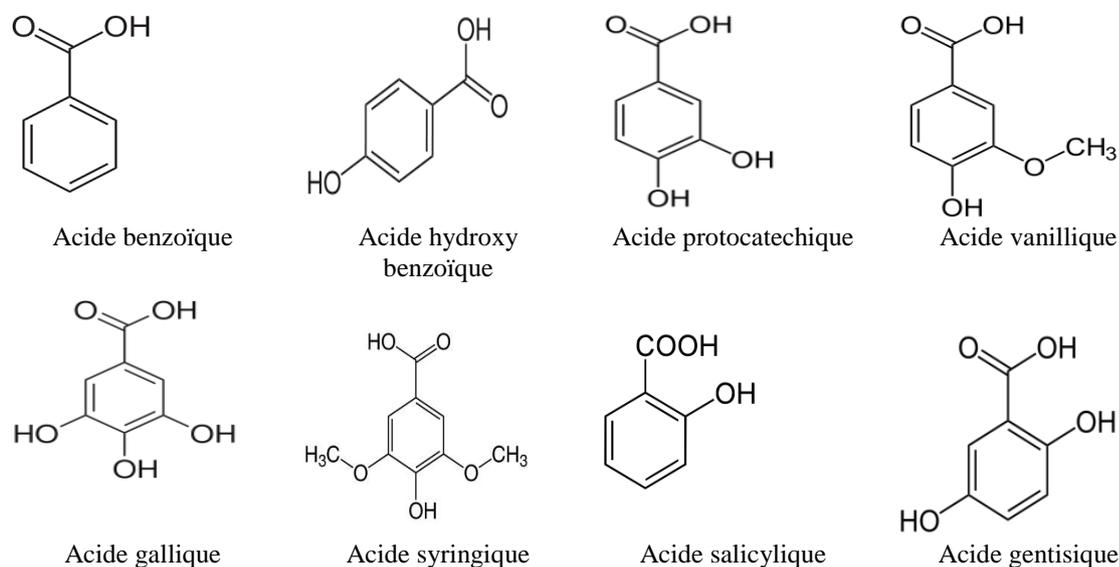


Figure 6 : principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

✓ Coumarines C6-C3

Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique, ils dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. (Figure.7).

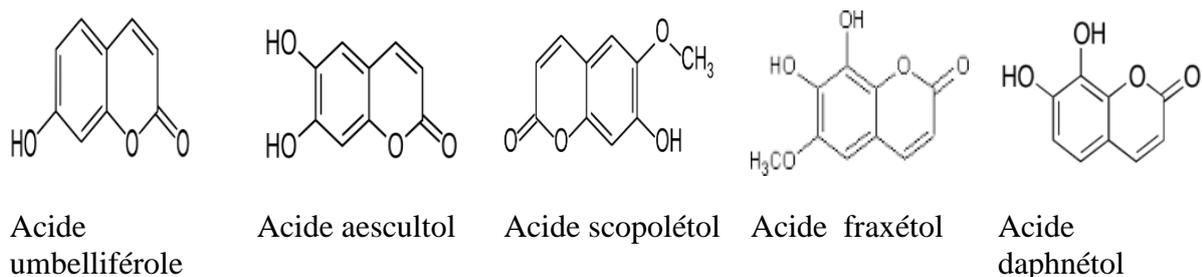


Figure 7 : principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005)

I.2.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques : shikimate et l'acétate-malonate (Mohammedi, 2013) (voire figure 8).

➤ Voie de Shikimate

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte (Martin et Tsitohaina, 2002).

I.2.2.2.3. Procédés d'extraction des Composés phénoliques

❖ Extraction solide-liquide " Macération "

Ce type est le plus simple des méthodes à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires. La technique est basée sur l'utilisation des solvants seuls ou en combinaison choisis en fonction de la famille de composés à extraire. Les solvants les plus utilisés sont d'ailleurs le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'eau. En effet, un même échantillon peut subir plusieurs macérations successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires et ce, pour obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt (Ibañez *et al.*, 1998).

Les travaux publiés par Justesen *et al.* (1998), par Escarpa et Gonzalez (1998) et par Careri *et al.*, (2001) préconisent l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des végétaux.

❖ Extraction au Soxhlet

L'appareillage Soxhlet, en utilisant des solvants offre une extraction continue des espèces chimiques contenues dans une matrice solide. Contrairement aux macérations classiques, l'échantillon, placé dans une cartouche poreuse est traversé par les vapeurs du solvant. Ces dernières, passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant.

Une fois le condensat atteint le sommet du siphon, le liquide retourne dans le ballon. Ce cycle est répété jusqu'à l'épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010 ; Bimakretal., 2011).

❖ Extraction au CO₂ supercritique

Il se caractérise par une vitesse de diffusion élevée et une viscosité faible qui en font une méthode de choix pour l'extraction des molécules végétales actives telles que les caroténoïdes, flavonoïdes et terpènes (Mukhopadhyay, 2000). Contrairement aux solvants organiques, l'utilisation du gaz inerte y compris le CO₂ à température ambiante présente l'avantage de ne laisser aucun résidu dans l'extrait et dans la matière première.

❖ Extraction par ultrasons

Il est analogue à celle aux solvants, sauf que les vibrations permettent d'extraire plus rapidement les constituants. Selon (Chemat *et al.*, 2004), cette méthode est plus rapide par rapport à l'extraction classique et celle par Soxhlet.

I.2.2.3. Flavonoïdes

Sont de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et al. , 2006), Ils constituent des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999). Ils se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Wiliams., 2000). (Fig.9)

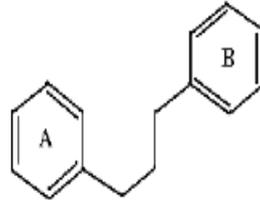


Figure 9 : Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963)

I.2.2.3.1. Classification des flavonoïdes

Les principaux groupes de flavonoïdes sont les suivants :

❖ Flavones et flavonols

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 (Morreel et al 2006).

❖ Flavanones et hydroflavonols

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 (Ono et al 2006).

❖ Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyamidol-3-O-rutinoside ou keracyanine (Bruneton 1999). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Bruneton 1999).

❖ **Chalcones et aures**

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aures sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone (Bruneton 1999, Ono et al 2006). Néanmoins, selon d'autres auteurs (Sarni-Manchado et Cheynier 2006), la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols.

I.2.2.3.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes

Généralement les hétérosides de flavonoïdes sont solubles dans l'eau et les alcools. Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires.

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, radical OH[•], oxygène singulet), inhiber la Lipoxygénase ou encore chélater les métaux.

I.2.2.3.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base ce qui explique leur origine commune de biosynthèse, L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalconesynthase, Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999) (voire annexe N°2).

I.2.2.3.4. Procédés d'extraction des Flavonoïdes

Plusieurs méthodes d'extraction des flavonoïdes ont été adoptées, basés sur une macération avec un solvant polaire (méthanol ou éthanol) selon la méthode de Charaux et Paris (Paris, 1954) (voire annexe N°3). L'extraction est réalisée à l'aide du méthanol ou de mélanges méthanol-eau.

C'est une méthode universelle qui consiste à stabiliser par macération d'une masse végétale séchée dans l'éthanol pendant une heure à une température de 96°C. par la suite, la drogue est pulvérisée grossièrement puis épuisée à l'aide d'un appareil de Soxhlet par l'éthanol porté à une température de 96°C pendant 4 heures.

Après une macération de 12 à 24 heures, les solutions éthanoliques sont évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris par l'eau bouillante, la solution aqueuse obtenue est laissée au repos pendant 24 heures. Enfin, la liqueur est épuisée dans une ampoule à décantation en trois étapes successive par l'éther, l'acétate d'éthyle et n-butanol.

I.3. Activité biologiques

I.3.1. Activité Antioxydante

Les antioxydants sont définis par (Halliwell, 1987) comme «toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» (Pastre et Priymenko, 2007). Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Tanguy *et al.*, 2009). En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, et stable dans le produit fin (Hellal, 2011). Ils sont capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. les Épices sont très riches en métabolites antioxydants, une vaste revue scientifique a classé la cannelle moulue au quatrième rang parmi les 50 aliments renfermant le plus d'antioxydants (Halvorsen *et al.*, 2006).

I.3.1.1. Mécanisme d'action

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2003).

Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces oxygénées radicalaires (EOR) et espèces azotées radicalaires (Fig. 10) (Benbrook, 2005).

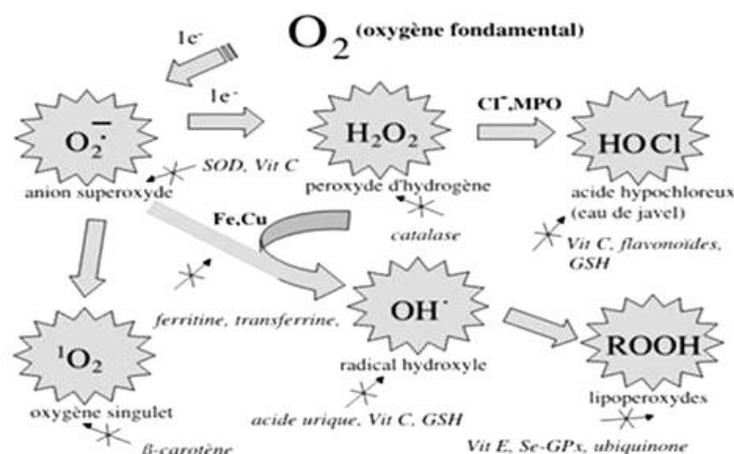


Figure10 : régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).

L'effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En fait, les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. (Hellal, 2011).

I.3.1.2. Méthodes d'étude de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres. Ces méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva et al., 2010). Notons, trois méthodes les utilisés sont : Test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène (β -crotène /Acide linoléique), DPPH⁺ (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

➤ Test de piégeage du radical DPPH

Ce test, utilise une réaction d'oxydoréduction avec le 2,2 pikrylhydrazyl radicale (DPPH) afin de déterminer la capacité anti -oxydante des extraits.

Le radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié d'azote et, après réaction avec l'atome d'oxygène d'un piègeur de radicaux de la réduction de DPPH-H (2,2- diphényl-1-picrylhydrazin) est formé, qui est jaune (Villano, et al., 2007). Le changement de couleur suivie par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait peut être déterminée (Molyneux , 2004).

La cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC₅₀); la valeur la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur d'IC₅₀ est exprimée en $\mu\text{g. ml}^{-1}$ (3 répétitions pour chaque concentration).

➤ Test de la réduction du fer FRAP "FerricReducingAntioxydant"

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Bougandoura, 2013). La réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (Ou et al., 2001).

➤ Test de blanchissement du β - carotène

Dans ce test l'activité antiradicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Kartal et al., (2007) (Kouamé et al., 2009).

I.3.2. Activité antibactérienne

Les microorganismes (champignons, bactéries, parasites, virus ...) se trouvent partout dans l'environnement. Dont certains de ces bactéries jouent un rôle très importante dans l'environnement (intervention dans le cycle biogéochimiques), et certains sont pathogène pour l'homme (tuberculeuse, fièvre, typhoïde), pour les animaux (brucellose mammites) et les plants (gales, fleurissement, tumeurs sur les racines) d'autres ont un effet bénéfiques sur l'organisme humain comme ceux qui vivent dans l'intestin et contribuent à la digestion (Kambouche 2009).

Plusieurs moyens de lutte sont utilisés pour combattre les microorganismes nuisibles :

- ✓ **En agriculture** (Besri, 1975) des méthodes biologiques (lutte biologique) et des méthodes chimiques (fongicides).
- ✓ **En médecine**, on utilise les antibiotiques. (Fritz 1992)
- ✓ **En pharmacopée**, de nombreuses substances bioactives obtenues par voie d'extraction sont utilisés (Leroux, Lamene, et Fritz 1992).

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le pouvoir antibactérienne in vitro des extraits hydro-alcooliques (méthanol /eau 80-20) d'*Inula viscosa* vis-à-vis des souches bactériennes.

❖ **Infections urinaires**

Une infection urinaire définie comme étant la présence du pus (leucocyte > 10⁵/ml) et de germe (> 10⁵/ml) dans les vois urinaires (Mathieu et Fonteueau, 2008).

❖ **Germes responsables des infections urinaires**

Les germes qui sont en cause des infections urinaires sont soit des entérobactéries, soit des Cocci **Gram⁺**

Tableau 3 : germe responsable des infections urinaires (Guillonneau ,1999)

Entérobacteries	Cocci Gram +
<i>Echirichia coli</i> : 80-90%	<i>Staphylocoques</i> : 5%
<i>Proteus mirabilis</i> :5%	<i>Streptocoques</i> : 28%
<i>Klebsiella et Enterobacter</i> : 2%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : 9.6%	

Les bactéries Gram⁻ sont plus résistantes aux celle des Gram+ aux anticorps en raison de leur paroi cellulaire impénétrable qui contient un couche peptidoglycane (sucres et acides aminés) (Hans Christian Gram, 1853-1938).

❖ **Types des infections**

Selon la localisation de l'infection (Mathieu et Fonteueau, 2008) on distingue deux types d'infection:

Infection urinaires hautes: situées au niveau du bassinet, il s'agit d'une pyélonéphrite.

Infections urinaires basses : situées au niveau de la vessie (Cystite), de l'urètre (Urétrite) et de la prostate (prostatite).

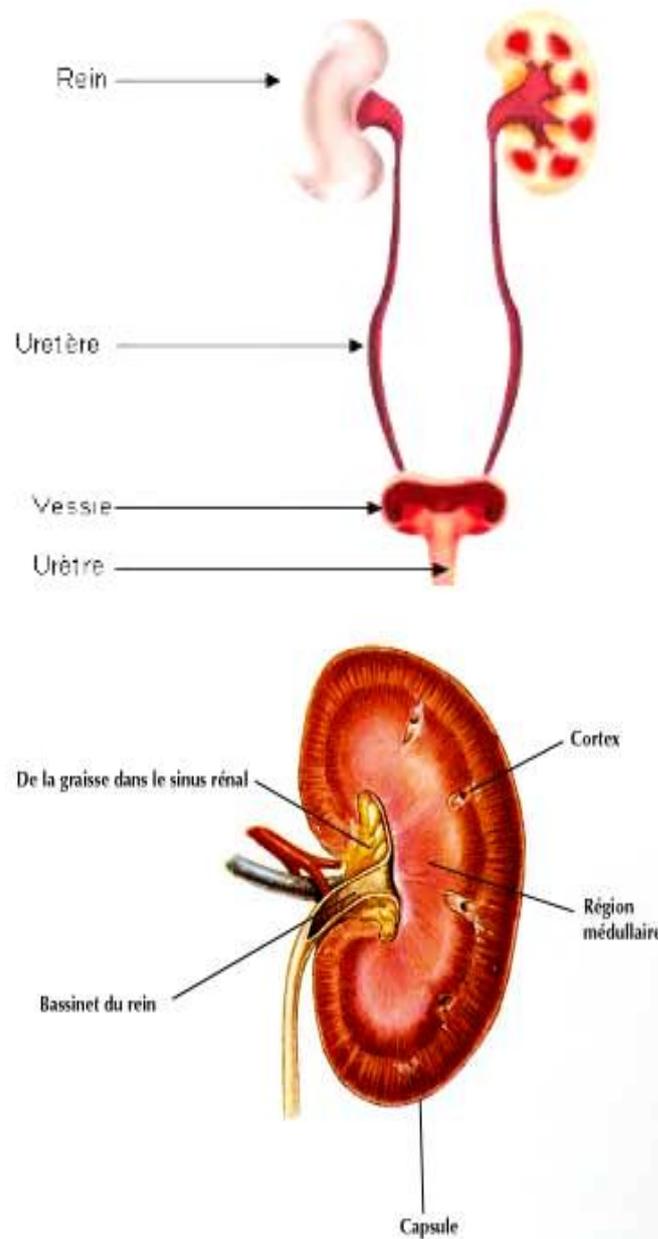


Figure 11: schéma des voies urinaires (Boutolle, 2011 ; Merck ,2008)

Chapitre II
Matériel et Méthodes

I.1. Matériels utilisés

Dans cette étude, des fragments de la partie aérienne et/ou souterraine d'*Inula viscosa*, une plante appartenant à la famille des Astéraceae ont été utilisés soit à l'état frais et/ou à l'état sec afin de valoriser ses principes actifs et ses activités biologiques. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie des populations et des organismes (B. P.O) et a duré 3 mois.

I.1.1. Matériel végétal

Le choix de la plante est basé sur l'usage des populations en médecine traditionnelle "*Inula viscoa*" a été récolté au mois de février 2017 de deux stations différentes : région 1 de «Hammadi» et région 2 de «Benyounes » de la wilaya de Boumerdes.



Aspect générale sur le champ

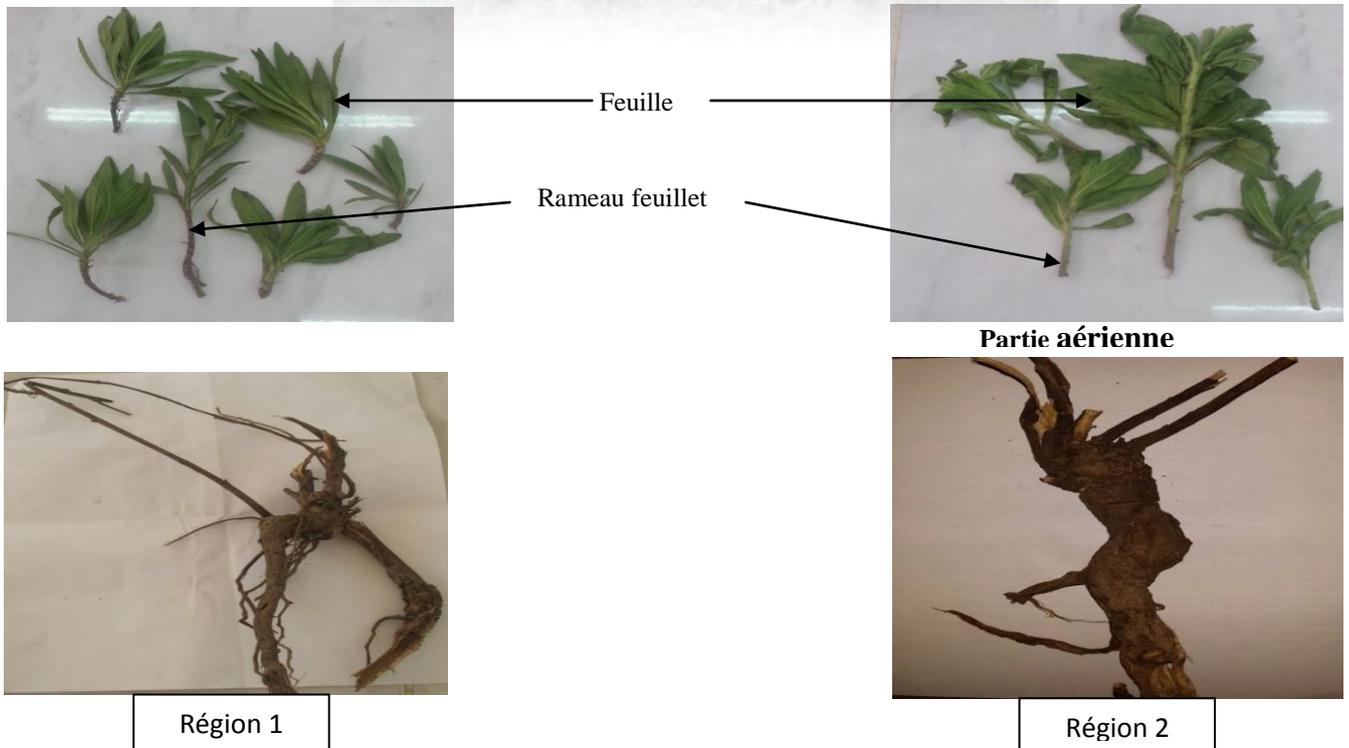


Figure 12: partie aérienne et souterraine d' *I.viscosa* (original, février 2017)

II.1.1.1. Position géographique des zones d'étude

Deux stations différentes de la wilaya de Boumerdes (Hammadi et Benyounes) ont été sélectionnés selon l'existence de la plante d'étude *I. viscosa*. Les deux stations présentent des climats et d'altitudes différents tableau 4.

Tableau 4 : Caractérisations des deux régions de récolte

Région de récolte	R1. Hammadi	R2. Benyounes
Localisation géographique	Ville interne située a cote de wilaya d' Alger daïra de Khemis El Khechna . entourée par Khemis El Khechna, Rouïba et Meftah.	ville côtière située au bord de la mer Méditerranée, daïra de Bordj Ménaïel. entourée par Zemmouri , Figuiet et Thénia.
Climats	Méditerranéen avec été chaud sec et d'hivers doux et humide	méditerranéen avec été chaud humide et d'hiver froid.
Latitudes	36° 40' 37" N	36°47 '8" N
Longitude	3° 16' 3" E	3°33 '36 E"
Altitude	32 mètre	47 mètre

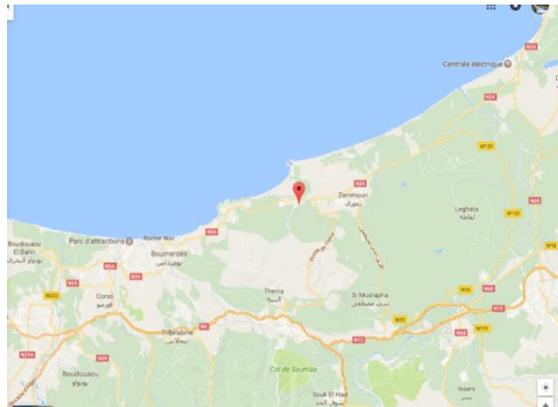
Site internet: www.google maps.com

Maps Data. 2017

Maps Data. 2017



Hammadi



Benyounes

Figure 13 : carte géographique des deux régions d'étude.

II.1.1.2. Récolte et Séchage

Les plantes ont été récoltées à la fin de la journée en évitant l'ensoleillement où la plante accumule le maximum des métabolites primaires et secondaires. Elle ont été séchées par la suit sur de papiers journal à l'abri de la lumière et à température ambiant pendant une semaine. Le papier est changé chaque jour pour éviter la dégradation des échantillons ou la contamination par des champignons.



Figure 14: partie aérienne d'*Inula viscosa* séché sur papier journal (Original, février 2017)

I.1.1.3. Préparation de la poudre fine

Après le séchage, les fragments de la plante ont été réduits en une poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.



Figure 15: poudre fine d'*Inula viscosa* (Original, février 2017)

I.1.2. Matériel microbien

Les souches bactériennes sur les quelles nous avons testé l'activité des extraits d'*Inula viscosa*, sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), des souches cliniques isolées de patients hospitalisés (l'hôpital de Thénia) pour des infections urinaires, Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

Tableau 5 : liste des souches bactériennes testées

Type	Gram ⁻	Gram ⁺
<i>Souche bactériennes</i>	<i>E. coli</i> 2592	<i>Staphylococcus aureus</i> 43300
	<i>E. coli</i> 84	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923
		<i>Entérocoques faecalis</i> 28.

I.1.3. Matériel non biologique

Les milieux de culture (GN, MH), des appareillages et des solvants utilisés lors de cette étude sont regroupés dans l'Annexe N°5.

II. 2. Méthodes expérimentales

II.2.1. Teneur en eau

Les fragments de la plante d'*Inula viscosa* des deux régions de Boumerdes ont été nettoyés de toutes débris de poussière et de sole, pesés préalablement à l'état frais, sont passé par la suite par un séchage dans l'étuve à 37- 45°C. Des pesés journalière de ces fragment ont été réalisés afin de déterminer la teneur en eau de cette plante.

La teneur en eau % du matériel végétale est donnée par la formule suivant :

$$\text{Teneur en eau \%} = (p - p1) / M * 100$$

P : massa en g de la prise d'essai avant séchage

P1 : massa en g de la prise d'essai après séchage

M : masse du matériel biologique de l'échantillon

A partir de la teneur en eau en détermine le taux de la matière sèche qui est donnée par la formule suivant

$$\text{Taux de matière sèche(\%)} = 100 - \text{teneur en eau \%}$$

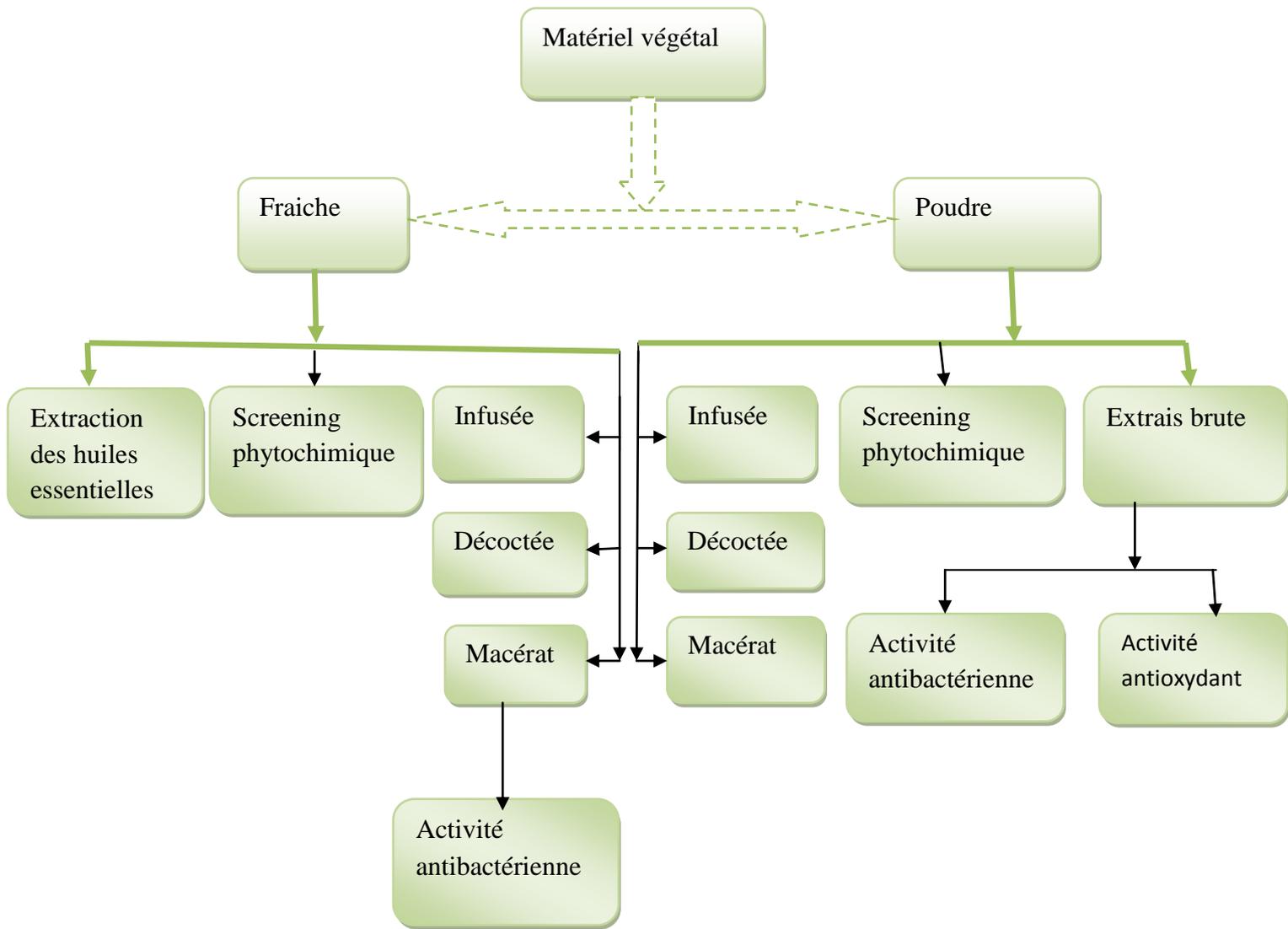


Figure 16 : schémas de Plan de travail

II.2.2. Etude anatomique

L'anatomie végétale est une branche de la botanique et de l'anatomie. Elle étudie la structure interne des végétaux (Dickison, 2000)

II.2.2. 1.Principe

Consiste à connaître en détail la position des tissus, le nombre des couches cellulaires, la forme des cellules et leurs organisations dans chaque tissu. Ou bien c'est de pouvoir d'étudier la structure histologique d'une plante (structure tissulaire).

Cette étude est basée sur une technique des coupes anatomiques à main levées et de la double coloration des tissus, il nécessite de colorer les tissus vivants à paroi pectocellulosique en rouge ou en rose par le rouge Congo, et les tissus morts à paroi lignifié en vert avec le vert de méthyle.

II.2.2. 2. Mode opératoire

II.2.2.2.1. Réalisation des coupes transversale

Des coupes minces à main levées ont été réalisées sur des fragments d'*Inula viscosa* à savoir la tige, les feuilles et la racine. Avant de passer à la double coloration, les coupes mises dans des tamis sont transférées dans un récipient contenant l'eau distillée pour éviter la dessiccation.

II.2.2.2.2. Double coloration Vert de Méthyle/ Rouge Congo

- **L'eau de Javel**

Les coupes fines réalisées sont mises sur un tamis dans un récipient rempli de l'eau de javel pendant 15 minutes afin de vider le contenu cellulaire puis rincées par l'eau distillée.

- **Acide acétique 1%**

Les coupes sont passées dans l'acide acétique et laissées pendant 1 minute (neutralisation de l'effet basique de l'eau de javel) puis rincées par l'eau distillée.

- **Vert de méthyle**

Les coupes sont placées dans le vert de méthyle pendant 10 minutes (coloration des parois lignifiées en vert, les parois subérisées en brun et les parois cutinisées en jaunes) puis rincées par l'eau distillée.

- **Rouge de Congo**

Les coupes rincées après la première coloration, sont passées dans le rouge Congo pendant 10 minutes (coloration des parois pecto-cellulosique en rose) puis rincées par l'eau distillée.

En fin, les coupes colorées sont récupérées dans de l'eau distillée.

II.2.2.2.3. Sélection des coupes

À l'aide d'une loupe binoculaire, les meilleures coupes (fines) ont été sélectionnées pour les préparés à l'observation microscopique.

II.2.2.2.4. Observations microscopique

À l'aide d'un microscope photonique, les coupes sélectionnées auparavant sont observés au faible grossissement pour déterminer la forme de la coupe et localiser les tissus puis passé au fort grossissement pour voir le détaille.

A l'aide d'une pince on met les coupes sur la lame puis déposé la lamelle sur les coupes

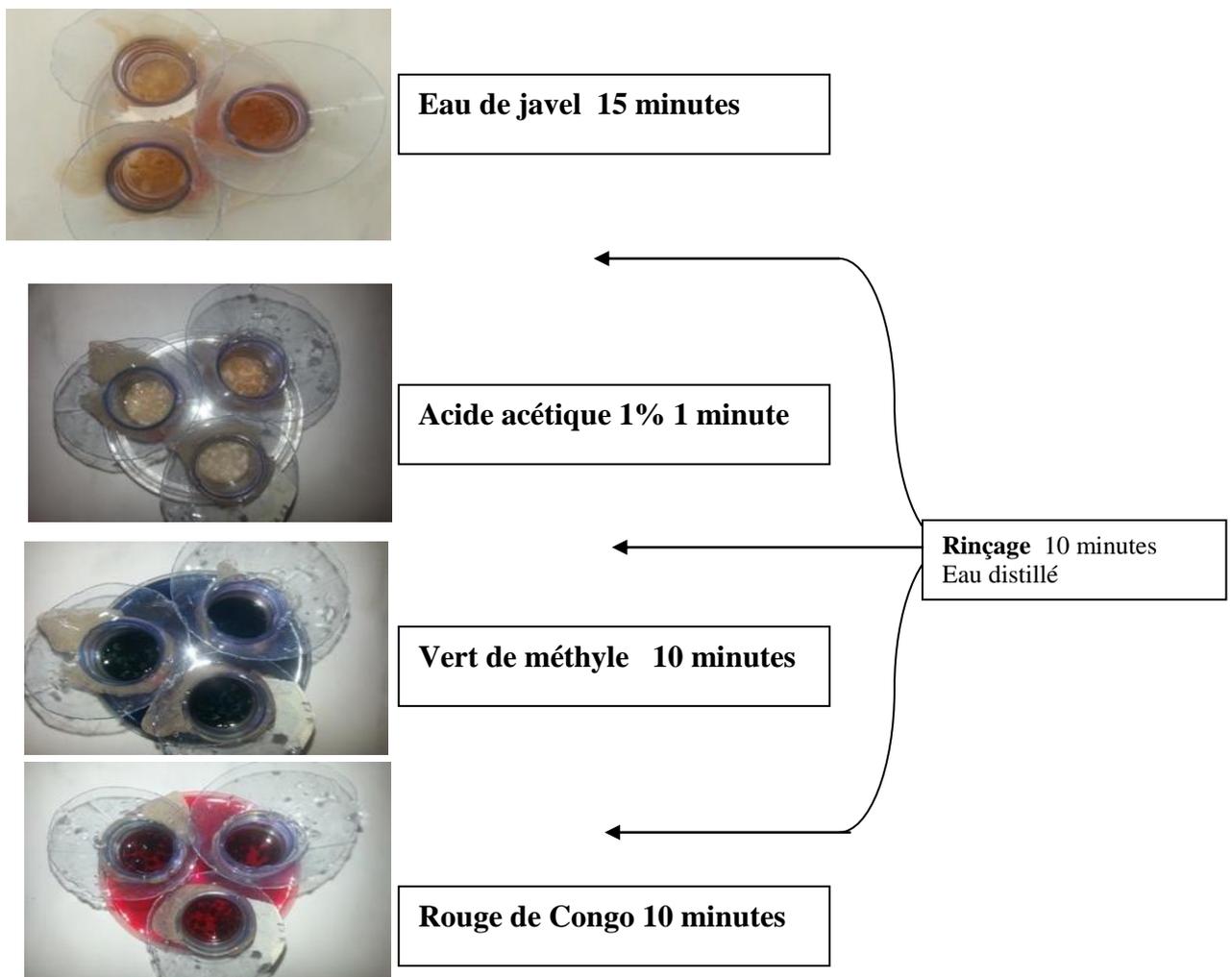


Figure 17 : étapes de la double coloration vert de méthyl - rouge congoo

II.3. Etude chimique d'*Inula viscosa*

II.3.1. Préparation des extraits aqueux

Trois préparations ont été réalisées dans cette étude soit le décocté, l'infusé et le macérât pour la partie aérienne fraîche et la poudre de la plante.

❖ Décoction a 5%

Dans un bécher, 5g de matière végétale (soit fraîche ou en poudre) de la partie aérienne de la plante est mis à ébullition dans 100 ml d'eau distillée pendant 20 min.

Après filtration, le filtrat relustrât est complété par l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

❖ Infusion 5%

Dans un bécher, 5g de matière végétale de la partie aérienne ou souterraine (racine) est mis en infusion dans 100 ml d'eau distillée chaude pendant 20 min.

Après refroidissement et filtration, le filtrat relustrât est complété par l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

II.3.2. Préparation de l'extrait brut hydro-méthoolique d'*I. viscosa*

❖ Macérât à 5 % de la matière végétale fraîche

Dans un bécher, 5g de matière végétale fraîche de la partie aérienne est mis en macérations dans 100 ml de mélange d'eau distillée/ méthanol (20/ 80) pendant 72 heures. Après filtration, le macérât relustrât est complété par l'eau distillée jusqu'à 100 ml le filtra est récupéré et conservé dans des flacons fermes à 4°C.

❖ Macérât à 25 % de la Matière végétale sèche

Dans un bécher, 25g de la poudre végétale de la partie aérienne est met en macérations dans 100 ml de mélange d'eau distillée 20ml et méthanol 80 ml pendant 3 jours à température ambiante. Par la suite, le macérât est filtré à l'aide de papier filtre (wathman).

Le filtrat est par la suite récupéré et placé dans un évaporateur rotatif à fin d'éliminer le solvant puis passé à l'étuve à 40°C pendant 24h jusqu'à la condensation de l'extrait en patte. L'extrait brut final sous forme pâteuse est conservé dans un réfrigérateur à 4°C.

II.4. Caractérisation chimique d'*Inula viscosa*

Une étude phytochimique (screening) a été réalisée dans le but de révéler la présence des principales substances bioactives dans l'infusé et décocté des échantillons de la partie aérienne et racinaire d'*Inula viscosa*.

II.4.1. Testes phytochimiques

✓ Principe

Consiste à réaliser un criblage des principales familles chimiques présentes dans la plante. Cette étape préliminaire servira dans le processus d'étude biologique. En effet, elle constitue une base de données sur les principaux métabolites existants dans des extraits. De plus, elle permet d'orienter l'interprétation des résultats (Chikhi, 2014).

✓ Mode opératoire

Les testes phytochimiques ont été réalisés selon le tableau suivant:

Tableau 6 : molécules recherchées, leurs réactifs de caractérisation et les résultats attendus (Harborne, 1998 ; Trease et Evans, 1989)

Molécules recherchées	Extrait e	Mesures	réactifs de caractérisation	Réaction
Tanins totaux	Infusé ou décocté	5 ml	Quelques gouttes de FeCl ₃ à 5 %	Coloration bleu noire
Tanins galliques		5 ml	2g d'acétat de sodium Quelques gouttes de FeCl ₃ à 5 %	Coloration bleu foncée
Tanins catéchiques		15 ml	7 ml de réactif de (10ml formole a 40% +5ml d'HCL)	Coloration rouge
Anthocyanes		5 ml	Quelques gouttes d'HCL	Coloration rouge
Saponosides		2 ml	Quelques gouttes d'acétate de plomb	Précipitation blanc
Flavonoides		5 ml	5 ml d'HCL + copon de Mg ²⁺ 1 ml d'alcool isoamylique	Coloration rouge orangée
Mucillages		1 ml	5 ml d'éthanol absolu	Précipitation floconneuses
Iridoides		2 ml	Quelques gouttes d'HCL sur plaque chauffante	Coloration bleu
Sucre reducteur		1 ml	Quelques gouttes de réactif Fehling	Coloration rouge brique
carotinoides		10 ml	3ml d'HCL +3ml H ₂ SO ₄	Coloration vert bleu
Amidon		2g	Quelque goutte d'iode I ₂	Coloration bleu violette
Glucosides		2g	Quelque goutte H ₂ SO ₄	Coloration rouge brique
coumarines		2g	20ml d'alcool éthylique bouillir à reflux 15 minutes 5ml de filtrat +5 goutte de KOH 10 %+ quelque goutte de HCL 10%	Formation d'un trouble
Quinones libres	Poudre	2g	Humectés par 2ml HCL + 20ml chloroforme Filtration après 3h Agité avec 5ml d'ammoniaque ½	Coloration rouge
Alcaoides		5g humictés par d'ammoniaque ½	Macération dans 50ml d'un mélange éther chloroforme (3v/v) pendant 24h Filtrat+l'acide chlorhydrique 2N + réactif de Dragendroff	Précipitation rouge

II.4.2. Extraction d'huiles essentielles

❖ II.4.2.1. Hydrodistillation type Clevenger

✓ Principe

Il correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant. Le distillat refroidi est composé de la phase huileuse et de l'eau. Ensuite les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (Pavida et *al.*, 1976).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (Pavida et *al.*, 1976).

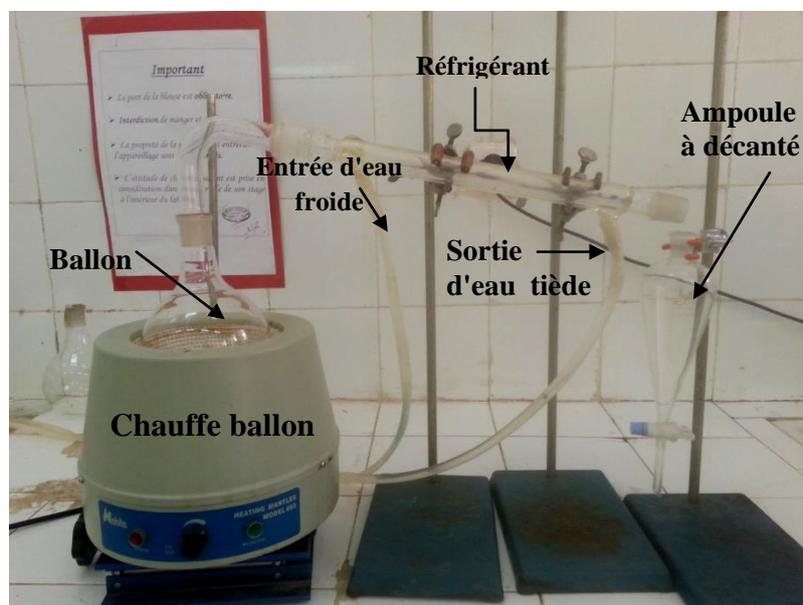


Figure 18 : Montage d'hydrodistillation type Clevenger employé pour l'extraction de l'huile essentielle

✓ Mode opératoire

L'extraction des huiles essentielles (HE) a été réalisée par hydrodistillation de type Clevenger pendant 2 à 3 heures (Pavida et *al.*, 1976).

50g de la partie aérienne sèche d'*I. viscosa* a été trempé dans 600 ml d'eau distillée, l'ensemble est ensuite porté à ébullition dans un ballon d'un litre surmonté d'une colonne reliée à un réfrigérant. Les vapeurs chargées d'huile et qui traversent le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Bencheikh, 2012). Les huiles essentielles recueillies par décantation à la fin de la distillation quelques gouttes d'éther diéthylique ont été ajoutées pour éliminer les traces d'eau

résiduelles et l'huile essentielle de *Inula viscosa* sera par la suite récupérée et stockée à 4° C à l'obscurité dans un flacon en verre approprié, hermétiquement fermé et couvert d'une feuille d'aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement (Bougerra, 2012; Mawussi, 2008).

❖ II.4.2.2. Hydrodistillation par micro-ondes assisté

✓ Principe

Ce procédé est basé entièrement sur le principe d'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieure du four (Félix Tomi, 2010).

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation ramenée à quelques minutes) tout en gardant la même composition chimique, l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Cinnamo muminers Reinw.* par hydrodistillation assistée par micro-ondes à 800 W a donné le même rendement (0.12%) que l'hydrodistillation et a permet de réduire la durée d'extraction à 30 minutes au lieu de 5 heures en ayant la même composition chimique avec une différence insignifiante (Phutdhawong et al., 2007)

✓ Mode opératoire

Les huiles essentielles (HE) ont été isolées par hydrodistillation assisté par micro-ondes. L'extraction a duré 8 à 9 minutes pour un mélange de 50g de matériel végétal sèche avec 75 ml d'eau distillée, l'ensemble est ensuite porté au micro-onde dans un ballon d'un litre surmonte d'une colonne reliée à un réfrigérant situés à l'extérieure du four. Les vapeurs chargées d'huile et qui traversent le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Quelques gouttes d'éther di éthylique a été ajouté au distillat pour récupérer le maximum d'HE. Ce dernier sera par la suite récupéré et stocké à 4° C à l'obscurité dans un flacon en verre approprié, hermétiquement fermé et couvert d'une feuille d'aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière.

La quantité d'essence obtenue est pesée pour calculer le rendement (Bougerra, 2012; Mawussi, 2008).

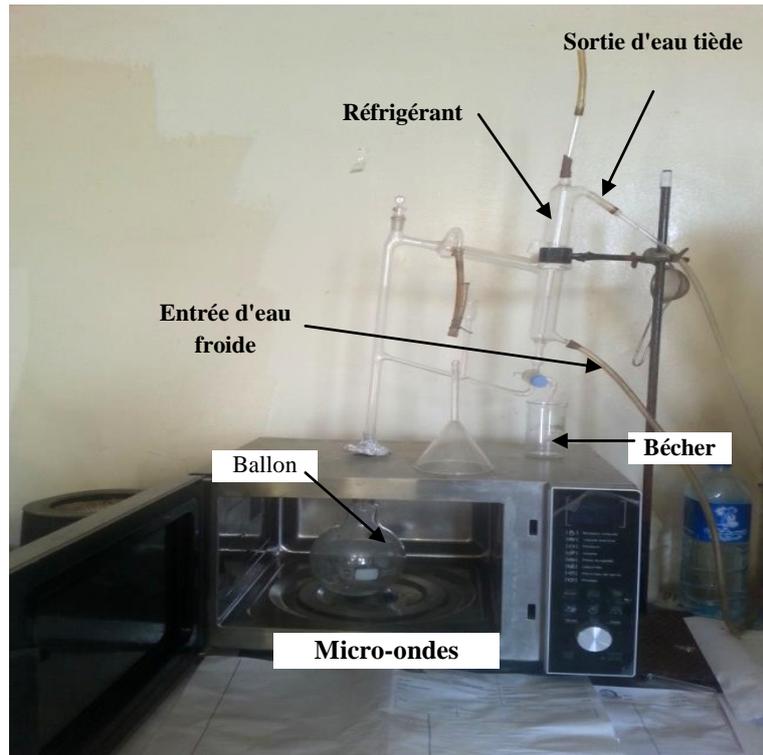


Figure19: Montage d'hydrodistillation sous micro-ondes employé pour l'extraction de l'huile essentielle

II.4.3. Analyse quantitative des extraits

Consiste à analyser la teneur en biomolécules présentes dans les extraits aqueux d'*I. viscosa*. Ceci, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à longueur d'onde appropriée pour chaque composé à doser.

II.4.3. 1. Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross (1965) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Marian et al., 2004). Ce réactif est en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daels-rakotoarison, 1999).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans des extraits végétaux (Ardestani et al., 2007).

✓ Mode opératoire

Un volume de 0,5 ml pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, additionné de 0,5 ml de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes, on rajoute 0,5 ml de carbonate de sodium 20% au mélange. Les tubes sont agités et incubés à l'abri de la lumière durant 1 heure (Chuah et al., 2008). L'absorbance est mesurée à 760 nm en utilisant le spectrophotomètre. Une courbe

d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

II.4.3. 2.Dosage des flavonoïdes totaux

✓ Principe

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux est effectuée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Djeridane et *al.*, 2006). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (Vladimir et *al.*, 2011).

✓ Mode opératoire

On ajoute 1 ml de l' AlCl_3 au 1 ml de chaque extrait. Le mélange est incubé pendant 10 mn et la densité optique est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la Quercétine pour calculer la concentration des flavonoïdes totaux dans chaque extrait. Les résultats de dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/ g MS).

II.4.4. Analyse qualitative des extraits par Spectroscopie infrarouge

✓ Principe

FTIR, est une technique spectroscopique infrarouge utilisant un interféromètre pour l'acquisition de données et une transformation de fourrier numérique pour le traitement des données.

Cette technique d'analyse moléculaire est basée sur l'étude des modes d'oscillations des arrangements d'atomes qui entrent en vibration dans des fréquences bien définies lors de l'émission de rayons infrarouges.

Elle permet d'obtenir des informations sur les liaisons chimiques et la structure moléculaire des matériaux analysée en détectant la présence de groupes fonctionnels par le mode vibratoire de leur lien. Domaine infrarouge : de 4000 et 400 cm^{-1} .

✓ Mode opératoire

Une à deux gouttes d'huile où de l'extraits est déposée et bien étalées sur la surface centrale du KBr à l'aide d'un compte-gouttes, pour chaque huile où d'extraits les mesures sont effectuées automatiquement le nettoyage de la cellule après chaque mesure est effectué avec du chloroforme.

Ce travail et réaliser au niveau de l'laboratoire de chimie à l'université M'Hamed bougera-Boumerdes (Faculté des sciences).

II.5. Activités biologiques

II.5.1. Activité antioxydant

II.5.1.1. Test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois, 1958; Brand-Williams *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Popovici *et al.*, 2009).

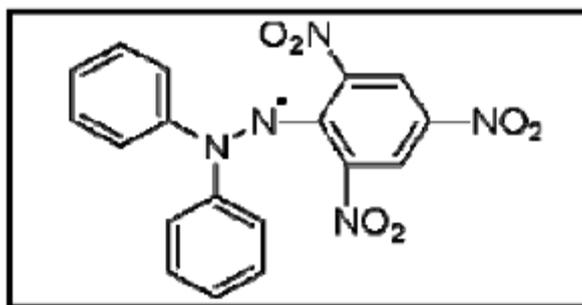


Figure 20 : structure chimique du radical libre DPPH (2,2 Di Phényle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici *et al.*, 2009).

II.5.1.1.1. Principe

La réduction du radical libre DPPH[•] (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Fig. 21) (Maataoui *et al.*, 2006).

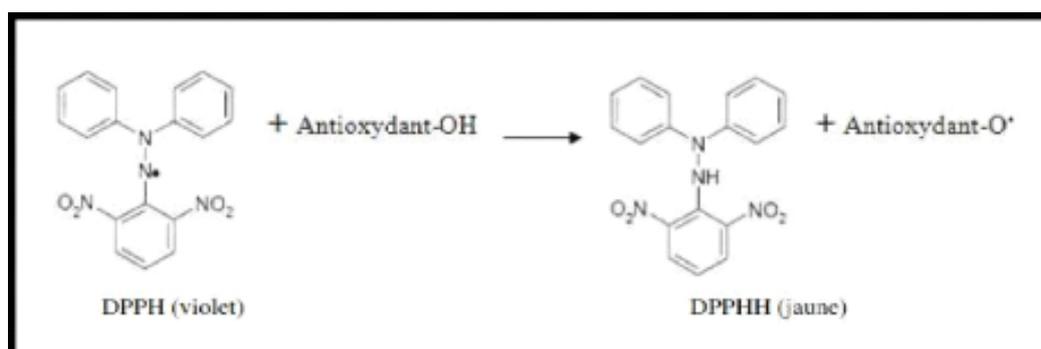


Figure 21 : réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Congo, 2012).

II.5.1.1.2. Préparation de la solution méthanolique de DPPH (à 0.0024 %)

La solution méthanolique de DPPH (0.0024 %) à été préparé à partir de 0.0024 g de DPPH à dans 100 ml de méthanol puis bien homogénéiser à l'aide d'un vortex. Par la suite une lecture d'absorbance à t_0 à été réalisé par spectrophotomètre à 517 nm.

II.5.1.1.3. Préparation des extraits

Pour cette étude, des macérats hydro-alcooliques préparés (méthanol/ eau : 80/20) de la poudre *Inula viscoa* ont été analysé.

Pour ce test, une solution mère à 1000 mg/ml de l'extrait brute hydro méthanolique à été préparé à base de 10 mg dans 1ml de méthanol. Une série de dilutions de l'ordre (1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/16, 1/32...etc.) à été préparés avec le méthanol.

II.5.1.1.4. Mode opératoire

Analyse spectrophotométrique UV à 517 nm

Pour le l'analyse de l'activité antioxydant, nous avons adopté la méthode de (Atoui et *al.*, 2005) 25ul de chaque solution méthanolique préparés à été prélevé et à rajouter à 975ul de solution méthanolique de DPPH préalablement prépare et mesurer à t_0 puis laissé incubés pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Sachant que, l'absorbance de la solution méthanolique de DPPH et des solutions des extrais préparées à été mesurer à t_{30} à $\lambda=517$ nm contre un blanc (25ul de méthanol avec 975ul de la solution méthanolique de DPPH).

II.5.1.2. Activité antibactérienne

➤ **Origines des souches microbiennes testées**

Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits brutes d'*Inula viscosa* sur cinq souches bactériennes : *E.coli* 25922 et *E.coli* 84, *Staphylococcus aureus* 43300 et *Staphylococcus aureus* 2592 et *Entérocoques* 28.

Les souches bactériennes étudiées dans ce travail ont été prélevés à des malades qui souffrent aux infections urinaire. Tous été fournis par le laboratoire d'analyses d'hôpital de Thénia.

Les caractéristiques de ces souches bactériennes sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 7: Principales caractères des souches bactériennes testées selon Fauchère et Avril, 2002).

Famille	Gram	Nom de la souche	Référence	Forme et mobilité
Enterobactériaceae	-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bacille Mobile
			84	
Enterococcaceae	+	<i>Enterocoques faecalis</i>	28	Cocci Mobile
Micrococcaceae	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300 ATCC25923	Cocci Immobil e

➤ **Identification et Conservation des cultures microbiennes**

Les souches bactériennes prélevés a partir des patients ont été cultivés dans des boites de Pétri contenant des milieux de cultures bactériennes appropriés pour les identifiés et les purifiés. Par la suite ces boites de Pétri sont conservées à - 4C°.

➤ **Etude de l'activité antibactérienne des extraits d'*Inula viscosa***

Deux extraits issus de macération hydro-méthanolique (de dose 1 g/ml pour l'extrait brute) de l'*Inula viscosa*.

Pour le premier extrait, une série de dilutions a été réalisée à partir de la solution mère (à 5%) à des concentrations décroissantes (1/2, 1/4, 1/8):

Pour le deuxième extrait brut pâteux, une série de dilution à été préparé à partir de la solution mère (1g /1 ml) de l'extrait brut avec de méthanol à des concentrations décroissantes (1/2, 1/4, 1/8) :

Tableau 8: différentes concentrations d'extrait brut SM et de macérat hydrol-alcoolique

	Dilution	Facteur de dilutions	Concentration g/ml
Extrait brut SM (1g /1 ml)	C 1 $\frac{1}{2}$	2	0,5
	C 2 $\frac{1}{4}$	4	0,25
	C 3 $\frac{1}{8}$	8	0,125
Macerat hydrol-alcoolique 5%	C 1 $\frac{1}{2}$	2	2.5
	C 2 $\frac{1}{4}$	4	1.25
	C 3 $\frac{1}{8}$	8	0.625

➤ **Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne**

✓ **Principe**

La sensibilité des souches bactériennes aux extraits se traduit par la formation des zones d'inhibition aux tours des disques chargés d'extrait. Lecteur des résultats se fait après 24 heures d'incubation.

✓ **Mode opératoire**

Les extraits hydro-méthanolique d'*Inula viscosa* ont été appliqués dans ce test sur cinq souches bactériennes photogènes (responsable aux infections urinaires) par la méthode des disques basé sur la technique de diffusion des extraits en milieu gélosé (Neggaz, 2002). Les milieux de Mueller Hinton ont étéensemencés par la méthode de strie à l'aide de pipettes Pasteur.

Cette activité nécessite de suivre des étapes suivants:

II.5.2.1.Préparation de pré-culture bactérienne

Cette étude nécessite des conditions aseptiques autours de bec bunsen et avec des boites de Pétri et des instruments stériles.

La gélose nutritif fondue à été collé après refroidissement dans des boites de Pétri stériles et laisser gélifiée. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on a prélever un à deux colonies et ensemencer a la surface du milieu de culture puis incubé dans l'étuve à 37C° pendant 24h.

II.5.2.2.Revivification des souches bactériennes

Consiste à ensemencer et revivifier chaque souche bactérienne dans des boites de Pétri contenant la gélose nutritive puis laisser incuber pendant 24h à l'étuve à 37C° .

II.5.2.3. Préparation de la suspension bactérienne inoculum

Consiste à prélever 2 à 3 colonies à l'aide d'une anse stérile, et les mettre en suspension dans un tube contenant 10 ml de l'eau physiologique. Après agitation, une bonne homogénéisation est assurée à l'aide d'un vortex. L'absorbance (D.O) de chaque suspension bactérienne à été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm. La densité de suspension bactérienne doit être comprise entre 0.2 et 0.3.

II.5.2.4. Ensemencement

Cette étape nécessite l'ensemencement des souches bactériennes de 24h aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton. Pour cela, la suspension microbienne à densité 0,2 à 0,3 à été ensemencé par la méthode de strié à l'aide d'un coton tige ou pipettes Pasteur.

II.5.2.4. Préparation des disques

A l'aide d'une pince stérile, 3 disques de 6 mm de diamètre préalablement stérilisés, sont imbibés par 20 µl de chaque extrait d'*Inula viscosa* à différentes concentrations ont été par la suite aseptiquement déposés sur la surface de milieu de culture.

II.5.2.4. Incubation

Les cultures bactériennes exposées aux extraits d'*I. viscosa* sont met au réfrigérons pendant deux heure pour assure une bonne imprégnation des extraits dans la gélose. Ensuite, elles sont incubées à l'obscurité pendant 18 à 24 h dans l'étuve à 37° (Neggaz, 2002).

En parallèle, des antibiotiques et des disques imprégnés du solvant (méthanol) déposés sur la surface de milieu de culture est considéré comme un témoin.

II.5.2.4. Lecteur des résultats

A l'aide d'une règle, des mesures de diamètres des zones d'inhibitions autour des disques chargés d'extrait ont été réalisé. Les résultats sont interprétés selon le tableau référence.

II.5.2.5. Test de sensibilité à l'antibiotique

L'étude de l'antibiogramme s'est limitée à tester les antibiotiques les plus utilisés en antibiothérapie tels que : Colistin (50ug), Vantamicin (30µg), hlorophinicol (30µg), Cilindamycin (2µg) et Spyramicin (100µg).

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier (même densité que celle testé avec l'extrait de plante).

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

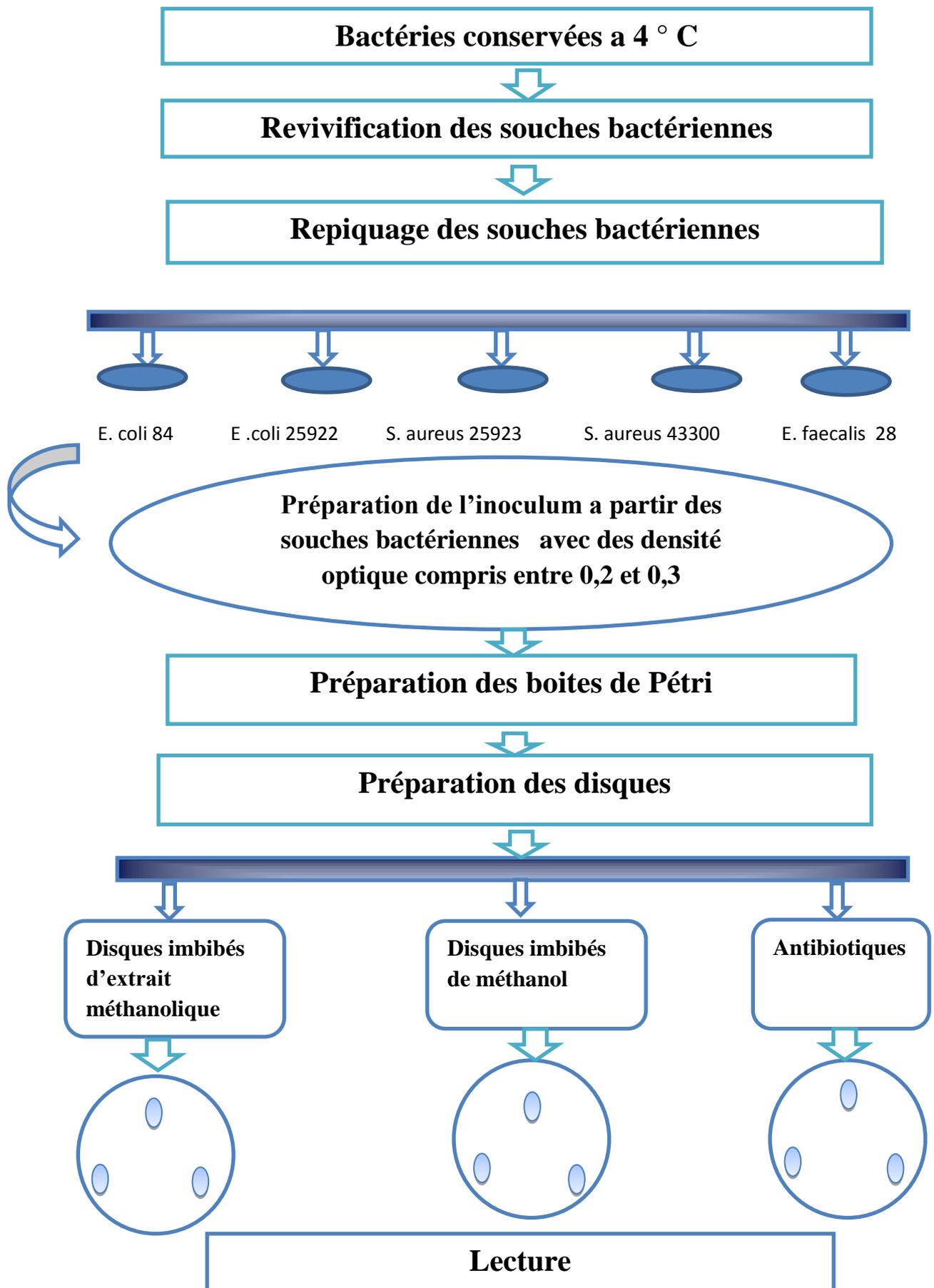


Figure 23 : schéma général du protocole expérimental de l'activité antibactérien

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1.Résultats

Dans cette partie, nous exposons les résultats obtenus quant à l'étude anatomique, phytochimique, à la teneur en humidité relative, au rendement des extraits aqueux et hydro alcoolique, et d'analyse spectroscopique par infrarouge à ceux de l'évaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne de l'*Inula viscosa* des deux régions Hammadi et Benyounes de la wilaya de Boumerdes.

III.1.1. Teneur en eau

La détermination de la teneur en eau (Humidité relative) a été réalisée selon la méthode décrite par Audigier (1978). Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 24.

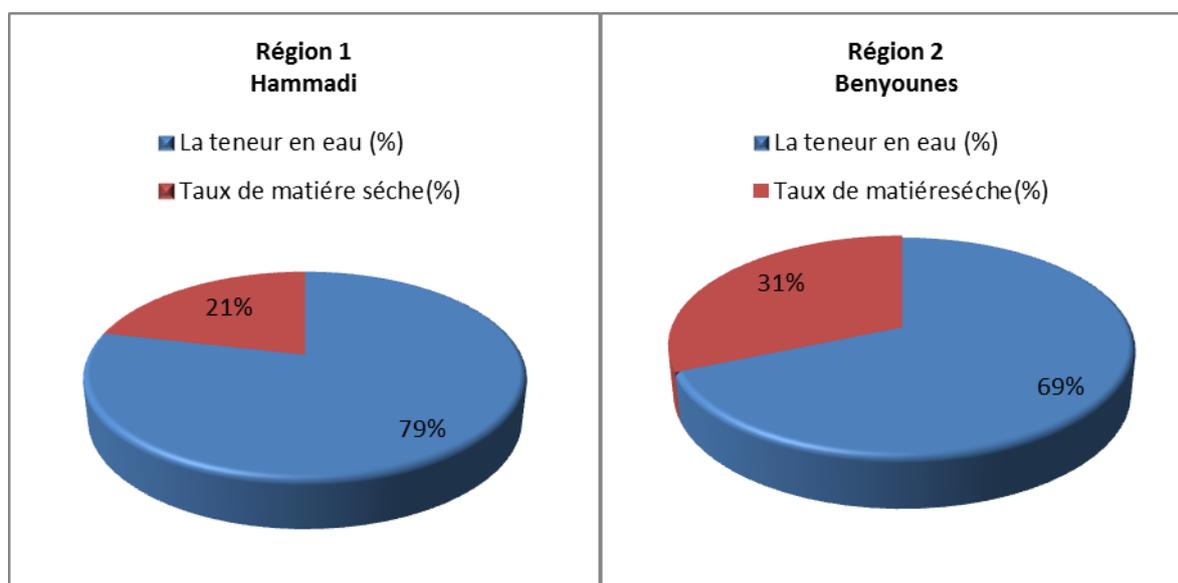


Figure 23 : humidité relative et matière sec d'*Inula viscosa* des deux régions

Le teste d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau de la plante étudiée, et de connaître la durée de séchage pour chaque plante, ceci diffère d'une espèce a une autre où d'une région à une autre.

Selon la figure 24, on peut constater que la plante *Inula viscosa* de Hammedi est très riche en eau avec un taux d'environ 79%, comparée à celle de la région de Benyounes 69%. Tandis que la matière sèche (MS) de la plante est représentée par une faible teneur avec 21%(MS) et 31% (MS) respectivement à Hammedi et Benyounes.

Ce la signifie que la majeure partie du plante est constituée d'eau où bien accumule des substances liquide où huileuse dans ces parties soit dans les poiles sécréteurs où dans des structures appropriées de sécrétion. Autrement dit, peut être la plante absorbe et stock de l'eau où de l'humidité externe dans le parenchyme lacuneux.

III.1.2. Étude Anatomique

Avant d'entreprendre toute activité biologique, une étude botanique complémentaire d'*Inula viscosa* a été effectuée visant à identifier la plante au-moyen de coupes histologiques. La détermination systématique de l'espèce a été complétée par une analyse histologique au microscope photonique permettant de rechercher la présence d'éventuels tissus de structures.

Il existe divers types tissulaires mis en place pour assurer une ou des fonctions spécifiques. Certains d'entre eux ont un rôle de revêtement, d'autres ont un rôle de soutien, de conduction et/ou de stockage de nutriments.

Les coupes transversales montrent de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants:

✓ Tissu de revêtement

➤ Épiderme

Représenté par l'épiderme cutinisé sur leurs feuilles et sur leurs tiges. Il est constitué d'une seule assise cellulaire (mono striée) juxtaposées, recouverte d'une cuticule (Wilson, 1993).

L'épiderme recouvre les organes aériens et les protège contre la dessiccation et les agressions extérieures tout en permettant de réguler les échanges gazeux avec l'atmosphère, Ainsi que La présence de cutine à la surface des cellules rend l'épiderme imperméable et permet de conserver son eau (Esau, 1965).

➤ Poils

Se localisent sur la face externe de l'épiderme, y a des poils sécréteurs et des poils tecteurs.

❖ Poils sécréteurs

Se sont des poils à pied bistrée allongée surmonter d'une tête allongée pluricellulaire .Ils assurent un rôle de protection chimique par sécrétion des métabolites appropriés contre les attaques des insectes.

❖ Poils tecteurs

Se sont des poils filiformes très allongés à pied mono-striée et à extrémité pointue en aiguille. Ils assurent un rôle de protection mécanique par mouvement.

➤ Suber

Dans la racine en remarque la présence de suber formé par un ensemble de cellules mortes imperméables contenant de la subérine, le suber est un tissu protecteur d'origine secondaire qui recouvre les organes de couleur brune.

✓ **Tissu de remplissage**

C'est le parenchyme, un tissu le plus volumineux dans la plante, ils se situent dans la région corticale (le cortex) et la région médullaire (la moelle) des tiges et des racines (Bouزيد, 2016) et même dans la feuille.

Le mésophylle foliaire, se trouve au niveau des feuilles, il est composé d'un parenchyme lacuneux à la face dorsale (inferieure) et un parenchyme palissadique chlorophyllien à la face ventrale (supérieure).

Concernant les tiges, on note la présence du parenchyme cortical (lacuneux et à méat), délimité par l'épiderme à l'extérieur, formé par des cellules à paroi mince et pectocellulosique, et au centre de la tige on retrouve un parenchyme médullaire à méat.

✓ **Tissu de soutien**

Les tissus de soutien sont constitués de cellules à paroi épaisse lui donnant une certaine rigidité, en particulier chez les plantes herbacées. Le sclérenchyme, est également un tissu primaire formé de cellules mortes dont les parois sont chargées de lignine (paroi secondaire épaisse et rigide imprégnée de lignine) (Bouزيد, 2016).

✓ **Tissu conducteur**

Permettent le transport de l'eau et des autres éléments absorbés ainsi que les différents produits de la photosynthèse vers toutes les parties de la plante.

Le système vasculaire est formé par le Faisceau Libero-Ligneux (FLL) ou Cribro-Vasculaire (FCV), ce dernier est composé de phloème et de xylème séparé par le cambium « qui est composé que d'une seule assise de cellules » et le liber (Bouزيد, 2016). Il y'a deux type de tissus conducteur selon l'âge des fragments de la plante : I^{aire} et II^{aire}.

✓ **Tissus conducteur primaire**

❖ **Phloème**

Il assure essentiellement la circulation de la sève élaborée, c'est-à-dire la sève enrichie des substances issues de la photosynthèse .Il est situé sur la face externe du Faisceau (FCV).C'est un tissu vivant, constitué de cellules ronds imbriquées l'une sur l'autre à paroi mince pecto-cellulosique.

❖ **Xylème**

Le terme xylème a été introduit par Nägeli (1858) et dérive du grec "xylos" qui signifie bois. Il est situé sur la face intérieure du Faisceau (FCV).C'est un tissu mort, constitué de cellules très allongées présentant des parois épaissies par des dépôts de lignine, interrompus par des endroits pour permettre le passage de la sève brute (Bouزيد, 2016).

III.2.1. Anatomie de tige

La coupe transversale de la tige jeune est sous forme ronde, présente des tissus primaires. D'après la coupe histologique, on distingue deux parties, l'écorce (périphérique) et le cylindre centrale (profond). Ce dernier est supérieur à l'écorce.

III.2.1.1. Ecorce

Comporte de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants :

C'est la partie périphérique de la coupe, où se trouve un tissu de revêtement, un tissu conducteur, un tissu de remplissage et de soutien.

Epiderme

C'est un tissu de revêtement, constitué d'une seule assise de cellules rectangulaires à parois pecto-cellulosiques fines de couleur rose, légèrement cutinisées, avec deux sortes de poils épidermiques sécréteurs et tecteurs (voire Figure 24).

- **Poils sécréteurs:** poils à pied bisériée et à tête sphérique pluricellulaire
- **Poils tecteurs:** poils à pied monosériée à extrémité pointue

Parenchyme cortical

C'est un tissu de réserve présenté par un parenchyme lacuneux où il est constitué de cellules de petites taille de forme arrondies à parois fines pecto-cellulosiques roses, liées en formats des lacunes.

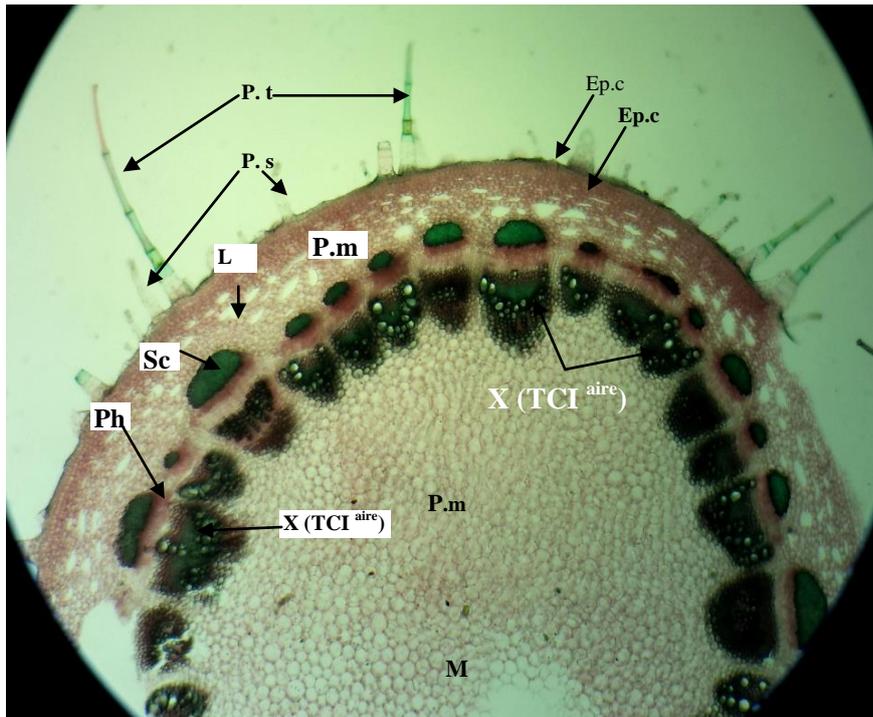
Des amas de cellules sclérenchymateuses (cellules mortes à parois épaisses lignifiées colorées en vert) se trouvent sous forme de pôles autour des amas de petites cellules de phloème (à parois fines roses).

III.2.1.2. Cylindre centrale

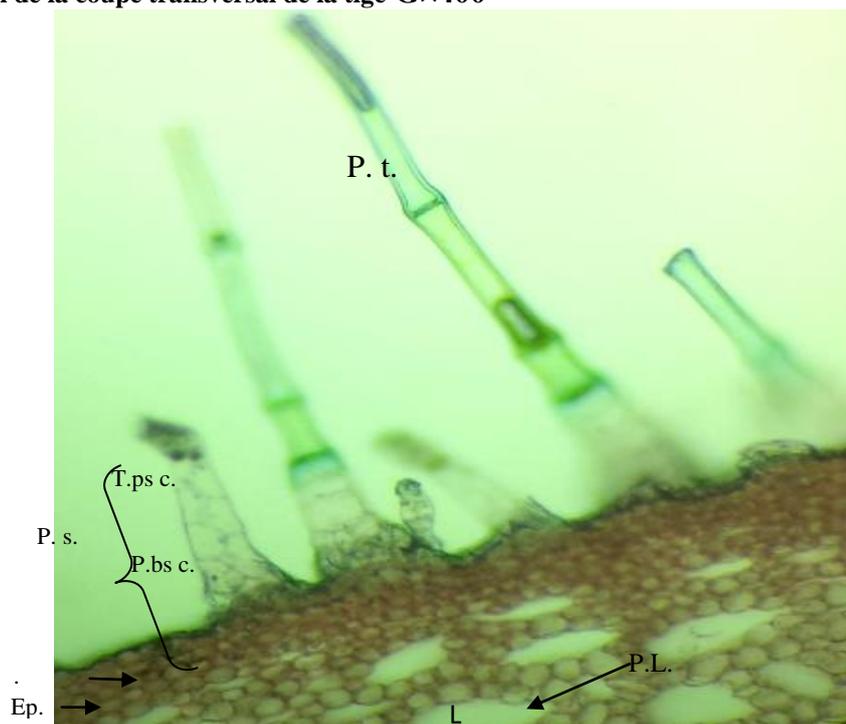
C'est la partie centrale de la coupe, où se trouve un tissu conducteur primaire et un tissu de remplissage. Elle occupe une grande portion de la coupe. Il renferme les tissus suivants :

Parenchyme médullaire à méat

Il se localise au centre de la coupe transversale, constitué de plusieurs assises de cellules à parois pecto-cellulosiques plus ou moins arrondies à parois fines, de grande taille aménageant des méats. Les parois cellulaires ont tendance à se sclérifiées en fonction de l'âge.



a. vue général de la coupe transversal de la tige G×400



b. détaille anatomique des poils épidermiques dans une coupe transversale de la tige

E.p: épiderme, **C:**cuticule, **P.s:** poil sécréteur, **T.p.s:** tête plurisériel, **P.b.s:** pied bisérie, **P.t:** poil tecteur filiforme monosérie. **P.l:** parenchyme lacuneux, **L.:** lacune. **P. m:** Parenchyme à méat ; **Sc:** sclérenchyme; **TC Iaire:** tissu conducteur primaire [**Ph:** Phloème; **x:** Xylème primaire]; **L:** Liber ; **M:** Moelle

Figure 24 : aspect anatomique de coupe transversale par la technique de la double coloration de la tige d'*Inula viscosa* au *Microscope photonique* (originale, 2017)

III.2.2. Anatomie de la feuille

La feuille est alliliforme (en ail), présente une symétrie bilatérale avec deux parties : Nervure centrale et limbe.

III.2.2.1. Nervure centrale

La coupe transversale montre une allure cordiforme (Figure 25) de la nervure central; nous observons, depuis la partie ventrale jusqu'à la partie dorsale les tissus suivants :

Epiderme

Il est constitué d'une assise de cellules plus ou moins rectangulaires à parois pecto-cellulosiques, colorées en rose, avec une abondance de poils sécréteurs et tecteurs.

Parenchyme à méats

Il occupe une surface très importante de la nervure centrale, constitué de plusieurs assises de cellules plus ou moins arrondies, à parois fines colorées en rose.

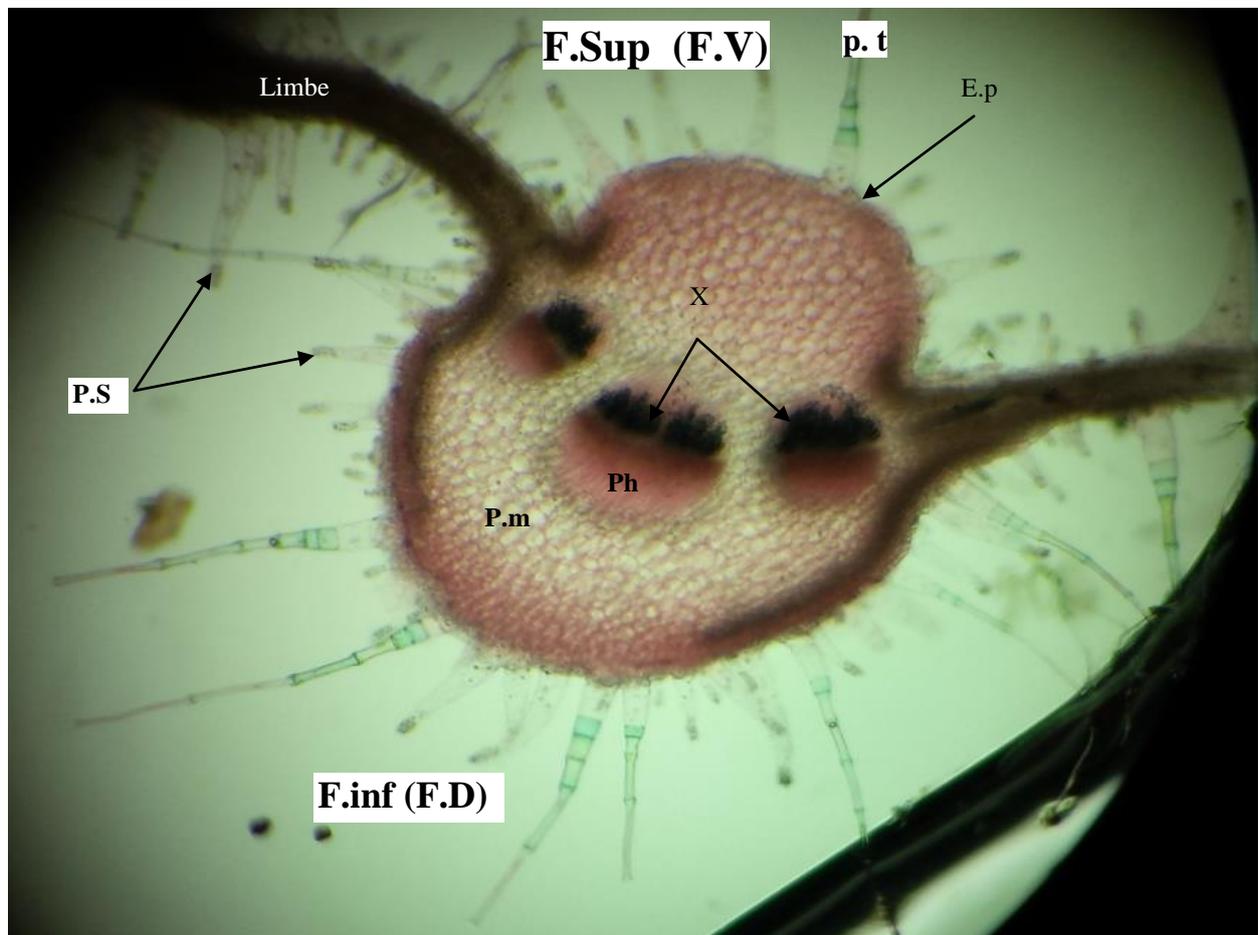
Faisceaux libéro ligneux

Ils sont représentés par trois faisceaux, dont deux petits situés de part et d'autre d'un faisceau central très développé en forme de croissant.

III.2.2.2. Limbe

Se trouve un Parenchyme palissadique sur la face dorsal de la feuille, et de parenchyme) à méat sur l'autre face. Il est constitué de cellules colorés en rose en forme de palissades plus hautes que larges, stocké de réserve soit libre où inclus dans des poches de sécrétion.

D'après IUCN (2005), le limbe est riche en produits de sécrétion qui pourrait être des huiles essentielles, en particulier les terpènes.



F.S (F. V): Face supérieure (face ventral),**F.inf(FD):** Face inférieure (face dorsal), **E.p:** Epiderme, **P.t:** Poil tecteur, **P.t:** Poil secreteur,**P.m:** Parenchyme à méat, **X:** Xylème, **Ph:** Phloème

Figure 25 : aspect anatomique de coupe transversale par la technique de la double coloration de la feuille d'*I. viscosa* observé au microscope photonique G ×40 (originale, 2017).

III.2.3. Anatomie de la racine

La coupe transversale de la racine jeune mais dure un peu est sous forme ronde, présente de l'extérieur vers l'intérieur les structures tissulaires suivantes (figure 26)

III.2.3.1. Ecorce

Suber

C'est un tissu de revêtement, constitué de plusieurs assises de cellules agencées en files radiales à parois fines colorées en vert marron. C'est un tissu suberifié à rôle protecteur. Ces cellules se mettent en parallèle avec celles de l'assise génératrice subero-phellodermique, plus petites de taille permettant de former le suber vers l'extérieur et le phelloderme vers l'intérieur.

Parenchyme cortical

C'est un tissu de réserve de type lacuneux, formé par de cellules arrondies à parois fines cellulosesques. A l'intérieur de ces cellules, se trouve des produits de sécrétion (**Figure 26**)

Sclerenchyme

Est un tissu de soutien à paroi lignifiée .Se trouve fortement imbriqué sur le phloème

I.2.3.2. Cylindre central

C'est la partie centrale de la coupe, où se trouve un tissu de remplissage et un tissu conducteur II^{aire} (bois hétéroxylé et le liber). Elle occupe une grande portion de la coupe.

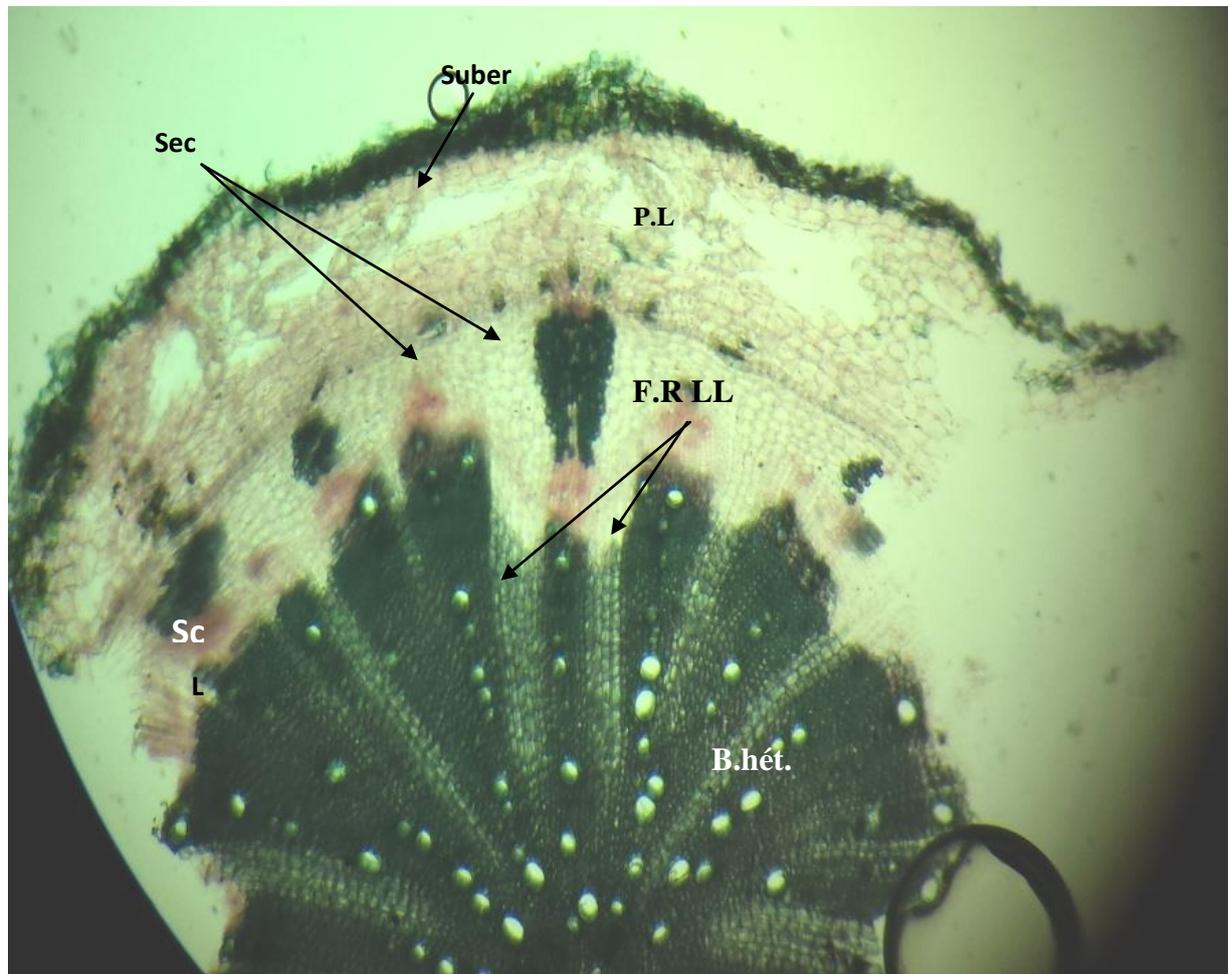
Liber

C'est un tissu conducteur secondaire, il est constitué par plusieurs couches de petites cellules rectangulaires à parois fines cellulosesques roses agencées en files radiales. Ces cellules sont traversées par des rayons libériens à cellules plus grandes disposées verticalement.

Bois

C'est un tissu conducteur secondaire, il est constitué de plusieurs vaisseaux entourés par un parenchyme ligneux vertical et plusieurs assises de parenchyme ligneux horizontal. Vers le centre.

Parenchyme médullaire : constitue la moelle réduite de la coupe, totalement sclérifiée.



P.L: Parenchyme lacuneux, **B.hét:** Bois heteroxylé, **F.R LL :** Fibrilles radiales liberolegumineuses, **M.red:** moelle réduit, **L:** liber, **Sc:** sclérenchyme.

Figure 26 : aspect anatomique de coupe transversale par la technique de la double coloration de la racine d'*Inula viscosa* observé au MP G×40 (original, 2017)

I.3. Études phytochimique

Les tests de caractérisation photochimique réalisés sur infusé, décocté des racines et de la partie aérienne d'*Inula viscosa* des deux régions révèlent la présence de plusieurs substances, les résultats de cette étude sont mentionnées dans les tableaux 9 et 10 :

Tableau 9 : résultats des tests de caractérisation photochimique

Substances	Réactions	Parti aérienne								Racine				
		Fraiche				Poudre				Inf.		Déc.		
		Inf.		Déc.		Inf.		Déc.		Inf.	Déc.	Inf.	Déc.	
		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Tanins totaux	Coloration bleu noire	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tanins galliques	Coloration bleu foncée	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	
Tanins catéchiques	Coloration rouge	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anthocyanes	Coloration rouge	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Saponosides	Précipitation blanc	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-	+	-	
Flavonoïdes	Coloration rouge orangée	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	
Mucilages	Précipitation flaconneuse	++	+	++	++	++	+	+	++	+	+	+	+	
Irridoïdes	Coloration bleu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sucre reducteur	Coloration rouge brique	-	-	-	-	+	+			-	-	-	-	
Carotinoïdes	Coloration vert bleu	-	-			-	-			-	-	-	-	

Tableau 10: résultats des tests de caractérisation photochimique

Substances	Réactions	Parti aérienne poudre	
		R1	R2
Amidon	Coloration bleu violette	-	-
Glucosides	Coloration rouge brique	+	+
Coumarines	Formation d'un trouble	-	-
Quinones libres	Coloration rouge	-	-
Alcaïdes	Précipitation rouge orange	--	-

Interprétation des résultats

D'après les résultats obtenus, on constate que *Inula viscosa* présente une diversité moléculaire en métabolites primaires et secondaires. L'étude phytochimique de la plante des

deux régions étudiées à montré une richesse en glucosides en tanins totaux en tanins gallique est en mucilages en flavonoïdes et en saponosides et absence d'amidon, coumarines, quinones libres, alcaoides , carotinoïdes , irridoides , anthocyanes , tanins catéchéniques et se la peut-être traduit que les conditions climatique influence sur la composition chimique du plant.

III.3.1. Extrait aqueuse de la partie aérienne fraîche 5%

D'après les résultats obtenus de l'étude phytochimique, on constate que l'infusé et décocté de la partie aérienne fraîche d'*Inula viscosa* présente une diversité moléculaire important en métabolites secondaire , dont il a montré une riches en tanins totaux, tanins galliques, saponosides, mucilages et absence des Tanins catéchéniques, Anthocyanes, flavonoïdes, Irridoïdes, Sucre réducteur et caroténoïdes pour les deux régions étudier .et se la peut-être traduit que les conditions climatique n'influence pas sur la compositions de la plant.

III.3.2. Extraite aqueuse de la partie aérienne (en poudre)

D'après les résultats obtenus, on constate que l'infusé et le décocté de la partie aérienne sèche d'*Inula viscosa* présente une diversité en composition chimique des métabolites, avec une richesse en tanins totaux, tanins galliques, saponosides, flavonoïdes, mucilages et absence des Tanins catéchéniques, Anthocyanes, Irridoïdes, Sucre réducteur et caroténoïdes pour les deux régions étudier .Cela peut-être traduit que les conditions climatiques n'influence pas sur la composition de la plante.

D'après ces résultats, on remarque une similarité entre la composition chimique en substances bioactives cherchés dans l'extrait aqueuse de la partie aérienne fraîche 5%et en poudre et de la racine 5%,sauf que, les sucres réducteurs sont présent uniquement dans l'infusé de la partie aérienne en poudre.

III.3.3. Extrait aqueuse de la racine 5%

l'étude phytochimique de l'infusé et le décocté de la partie racinaire fraîche d'*Inula viscosa* montré une diversité moléculaire en métabolites secondaires, avec une richesse en tanins totaux, mucilages et absence des Tanins catéchéniques, Anthocyanes, flavonoïdes, Irridoïdes, sucre réducteur et des caroténoïdes pour les deux régions étudier.

Notons aussi, la présence des Tanins galliques dans l'infusé des deux régions et dans le décocté de la deuxième région Benyounes contrairement à la premier région Hammedi où ils sont absentes. De plus, les saponosides sont présentes dans l'infusé et le décocté de la premier région Hammedi et absentes dans la deuxième région Benyounes.

III.4. Rendement et caractérisation des extraits

III.4. 1. Rendement en HE

L'extraction des huiles essentielle d'*I.viscosa* à duré 3H en maximum par hydrodistillation type Clivernger. Tandis que, des traces d'HE extraites de la poudre d'*Inula viscosa* par microonde à duré 10 min

Les résultats des rendements sont reportés dans le tableau suivant:

Tableau 11: Rendement et propriétés organoleptiques de l'HE d'*Inula viscosa*

Méthode d'extraction	Couleur	Aspect	Odeur	Rendement%	
Huile essentielle poudre par hydrodistillation et par micro onde	Jaune pâle	Liquide	Forte très volatil	0.16	0.15

Un rendement très faible en HE chez *Inula viscosa* à été noté, qui se rapprochant pour les deux régions de collecte. Celle de Hammedi est de l'ordre de 0.16 % et celle de Benyounes est de l'ordre de 0,15%.

III.4. 2. Rendement en polyphénols totaux

L'extrait de la partie aérienne fraîche et sèche (infusée, décoctée, macérat hydrique et macéra hydroalcolique) et de la racine (infusée et décocté) sont varié entre 5 et 9 % pour les deux régions étudiées.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraites étudiées sont illustrés dans le tableau 12

Tableau 12 : Rendement d'extraction et propriétés organoleptiques des extraits aqueux et hydrométhanolique d'*Inula viscosa* des deux régions.

			Couleur	Aspect	Odeur	en g		Rendement %		
			R 1 et 2	R1 et R2	R1 et R2	R 1	R 2	R 1	R 2	
Partie aérienne	fraîche	Infusée	Vert claire	liquide	faible	0.07	0.09	7	8	
		Décoctée				0.06	0.08	6	8	
		Macéra hydrique				0.09	0.09	9	9	
		Macéra hydroalcolique				/	/	/	/	
	poudre	Infusée	Maronne verdâtre				0.08	0.09	8	9
		Décoctée	Maronne				0.06	0.06	6	8
		Macéra hydroalcolique	Verte foncé	gomme collante pâteuse	forte	/	/	3.226 g	4.396 g	
Racine		Infusée	Vert claire	liquide	Faible	0.07	0.09	7	9	
		Décoctée	Maronne claire	liquide	Faible	0.05	0.07	5	7	
Huile essentielle poudre			Jaune pâle	Liquide	Forte très volatil	0.083	0.075	0.16	0.15	

III.4.3. Résultats de l'analyse quantitative

III.4.3. 1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits, les dosages spectro-photométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués. Deux droites d'étalonnages ont été tracées pour cet objectif qui est réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentration.

III.4.3.1.1. Evaluation de la teneur des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Marian *et al.*, 2004). L'acide gallique a été utilisé comme étalon (Figure 27). Les résultats sont représentés dans le tableau 13.

La courbe étalonne d'acide gallique à différentes concentrations est utilisé comme standard, montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment (Mujica *et al.*, 2009).

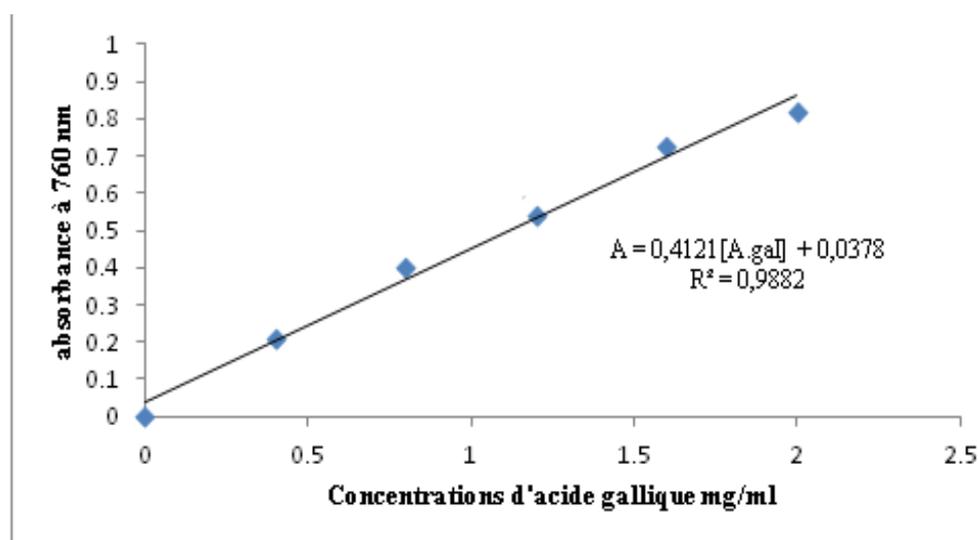


Figure 27 : droite d'étalonnage des polyphenol totaux (Benhbillesse)

Tableau 13 : Teneur en polyphénols totaux de l'*Inula viscosa* dans les extraits (mg Eq.AG/g MS)

		Région 1	Région 2
Partie aérienne	Fraiche		
		Infusée	218,81
		Décoctée	154,62
		Macérat	424,16
Racine	Poudre		
		Infusée	1236,98
		Décoctée	128,41
		Infusée	9,37
		Décoctée	30,59

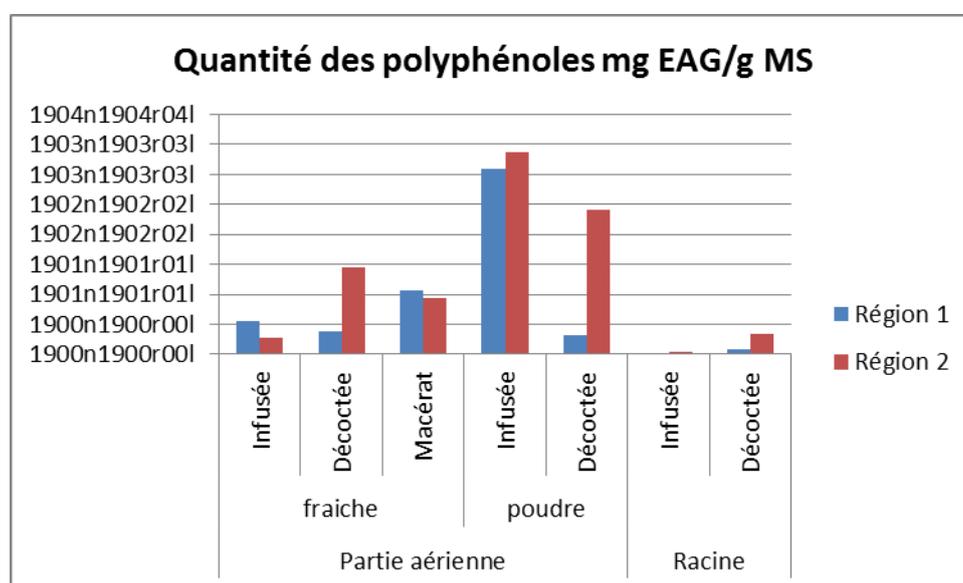


Figure 28 : Teneurs en polyphénols totaux de l'*Inula viscosa* dans les extraits (mg EAG/g MS)

Interprétation

D'après les résultats, le taux des polyphénols totaux dans les extraits issus d'*I. viscosa* de la deuxième région est plus élevé à celle de la première à part dans le macéra et infusée de la partie aérienne, le taux des polyphénols totaux le plus élevé par rapport des autres extraits est présent dans l'infusée de la partie aérienne poudre d'une valeur de 1347,92 mg EAG/g MS.

D'où les autres extraits qui contiennent le taux élevé des polyphénols totaux sont l'infusée de la partie aérienne poudre de la première région 1236,98 mg EAG/g MS, la décoctée de la partie aérienne poudre 961,32 mg EAG/g MS et la décoctée de la partie aérienne fraîche 578,88 mg EAG/g MS de la deuxième région puis le macéra hydrique frais de la partie aérienne de la première et la deuxième région par des valeurs de 424,16 mg EAG/g MS et 378,25 mg EAG/g MS respectivement.

Les taux les plus faibles des polyphénols totaux sont dans l'infusée de la racine des deux régions représentés par des valeurs de 9,37 mg EAG/g MS pour la première région et de

18,38mg EAG/g MS pour la deuxième et dans le décoctée des racines de la premier région d'une valeur de 30,59mg EAG/g MS puis dans l'infusée de la partie aérienne fraiche de la première région d'une valeur de 113,79mg EAG/g MS.

La courbe étalonne d'acide gallique à différentes concentrations est utilisé comme standard, montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment Mujica *et al.* (2009).

III.4.3.1.2. Evaluation de la teneur des flavonoïdes

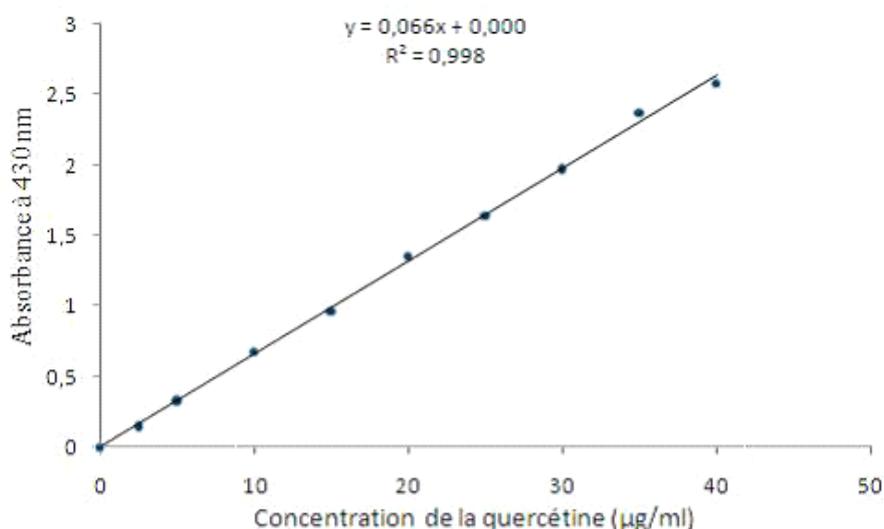


Figure 29: droite d'étalonnage des flavonoïdes (moyenne ± SD de trois mesures) (Yakhlef G, 2010).

Tableau 14 : Teneur en flavonoïdes de l'*Inula viscosa* dans les extraits (mg EQ/g MS)

			R1	R2
Partie aérienne	Fraiche	Infusée	10,72	1,59
		Décoctée	3,44	2,27
		Macérat	2,97	0,26
Racine	Poudre	Infusée	16,5	12,07
		Décoctée	0,97	8,4
		Infusée	1,114	1,29
		Décoctée	0,478	3,18

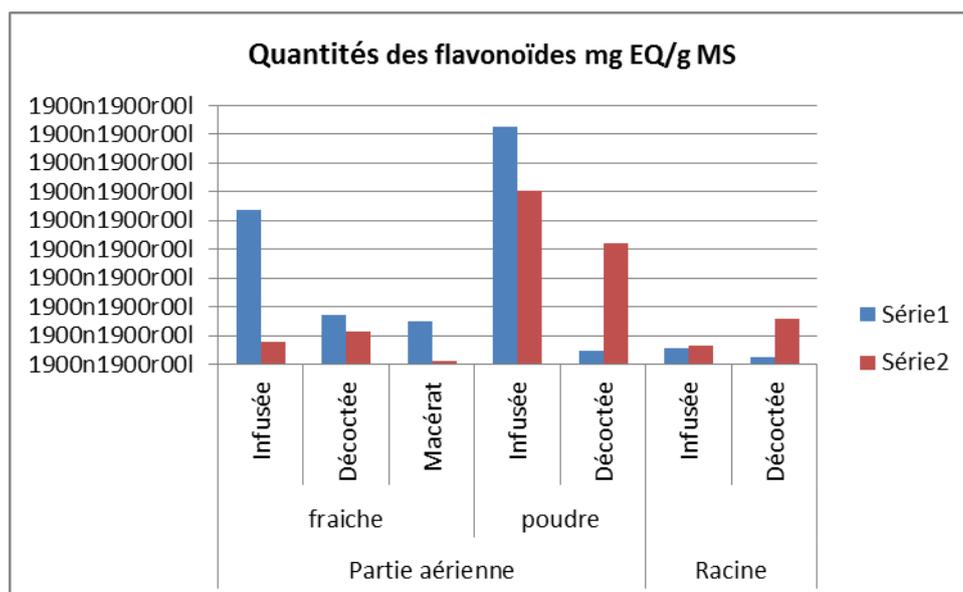


Figure 30 : teneur en flavonoïdes de l'*Inula viscosa* dans les extraits (mg EQ/g MS)

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que les extraits sont faibles en flavonoïdes

D'où le taux le plus élevé des flavonoïdes présent dans l'infusée de la partie aérienne poudre de la première puis de la deuxième région par des valeurs de 16,5mg EQ/g MS ; 12,0727mg EQ./g MS respectivement, ainsi dans le décoctée de la partie aérienne poudre de la deuxième région 8,4mg EQ./g MS et dans l'infusée de la partie aérienne fraîche de la premier 10,727mg EQ/g MS.

D'après les résultats le taux le plus faible des flavonoïdes est dans le macéra hydrique de la partie aérienne fraîche de la deuxième région d'une valeur de 0,2645mg EQ/g MS, ainsi les autre faible taux sont présents dans le décoctée et infusée de la racine et dans le décoctée de la partie aérienne poudre de la première région représenter par des valeurs 0,478mg EQ/g MS; 1,114mg EQ/g MS;1,5909mg EQ/g MS respectivement.

III.4.4. Résultats d'analyse chimique des extraits par Spectroscopie infrarouge

Après le passage des extraits brut et d'HE d'*Inula viscosa* dans le spectre d'infrarouge. Les résultats sont exprimés par des graphes suivants :

- Infusée de la partie aérienne fraîche

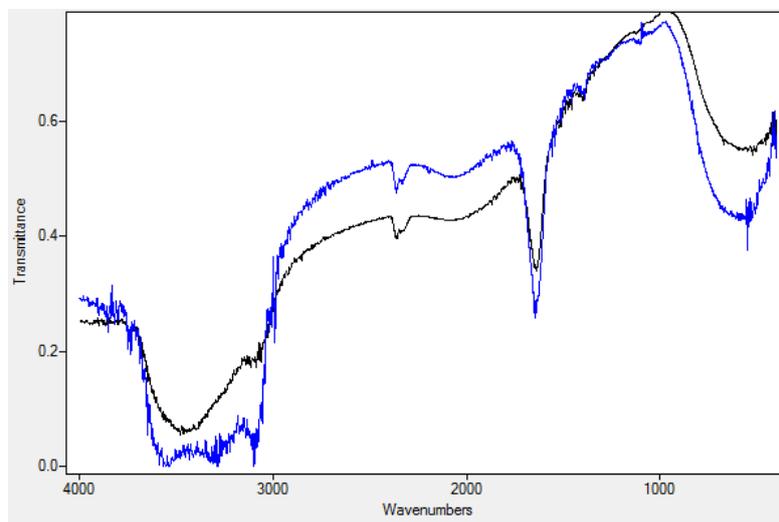


Figure 31 : spectre infra rouge de l'infusé de la partie aérienne fraîche d'*I. viscosa*

Tableau 15: illustration des liaisons chimiques de l'infusé de la partie aérienne fraîche d'*I. viscosa*

	Nombre d'onde (cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Region 1	2994.90	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2359.56	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2326.30	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1647.72	C=C	céton	Variable	Elongation
Region 2	2362.89	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2326.30	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1637.75	C=C	céton	Variable	Elongation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une forte liaison chimique de type Cétones (C=C) pour les 2 régions avec la présence d'autre faible liaison chimique de type Acides (O-H), trois au niveau de infusée de la partie aérienne fraîche de la premier région et deux au niveau de la deuxième.

• Décocte de la partie aérienne fraîche

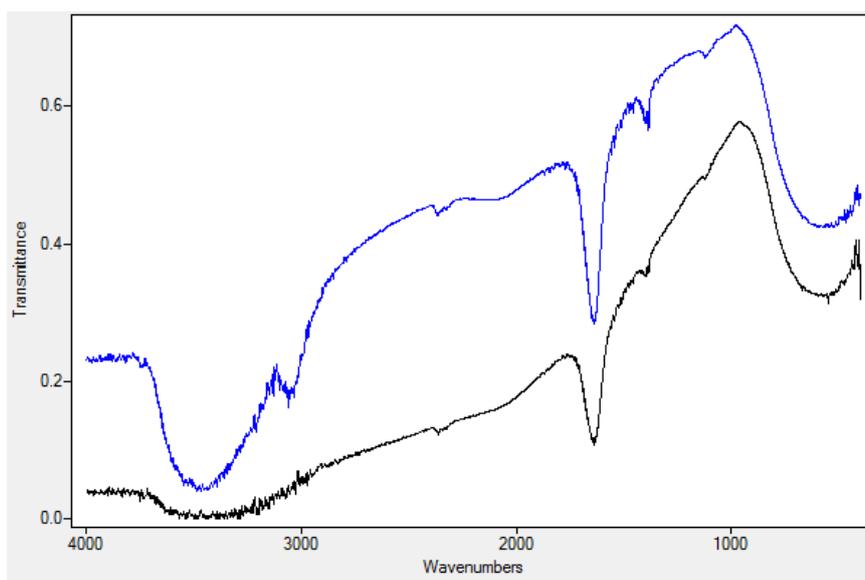


Figure 32 : spectre infra rouge de Décocte de la partie aérienne fraîche d'*I. viscosa*

Tableau 16 : illustration des liaisons chimiques de Décocte de la partie aérienne fraîche d'*I. viscosa*

	Banda(cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Region 1	3061,48	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2366,22	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1637,75	C=C	Cétones	Forte	Elongation
	1404,9	C-O-H	Acides carboxylique	Forte	Deformation
Region 2	1384,04	CH3	Tétraédrique	Forte	Deformation
	1637,75	C=C	Cétones	Forte	Elongation
	1394,92	CH3	Tétraédrique	Forte	Deformation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une forte liaison chimique de type Cétones (C=C), et la présence d'une liaison chimique faible de type acides (CH3) pour les 2 régions.

Avec d'autres faibles liaisons chimiques au niveau de la première région de type alcool (O-H) et de type Acides carboxylique (C-O-H).

• **Infusé des racines**

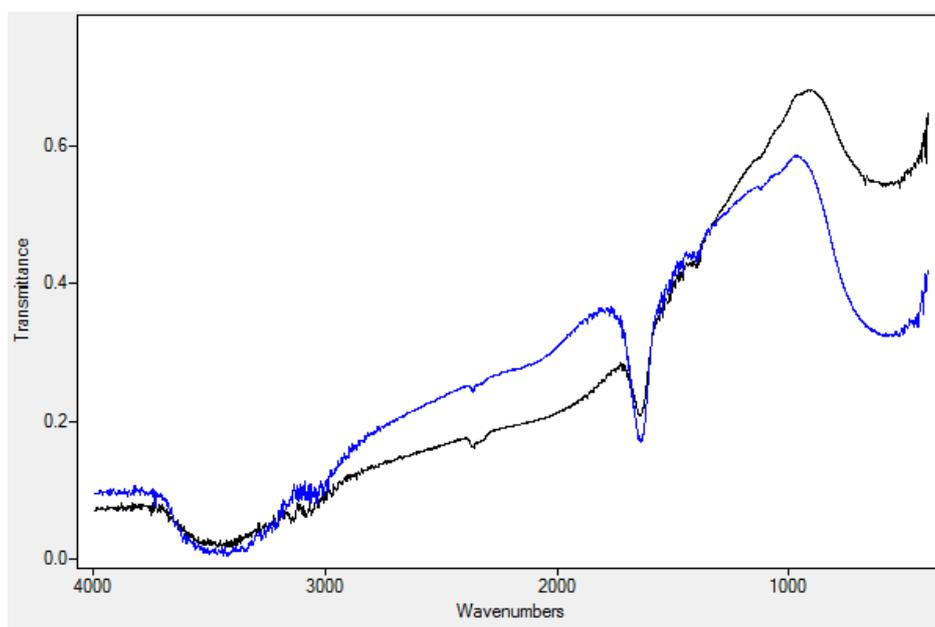


Figure 33 : spectre infra rouge de infusée des racines d'*I. viscosa*

Tableau 17 : illustration des liaisons chimiques de infusée des racines d'*I. viscosa*

	Banda(cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Région 1	1641,07	C=C	Cétones	Forte	Elongation
Région 2	1634,42	C=C	Cétones	Forte	Elongation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une forte liaison chimique de type Cétones (C=C) pour les deux régions.

• **Décocté des racines**

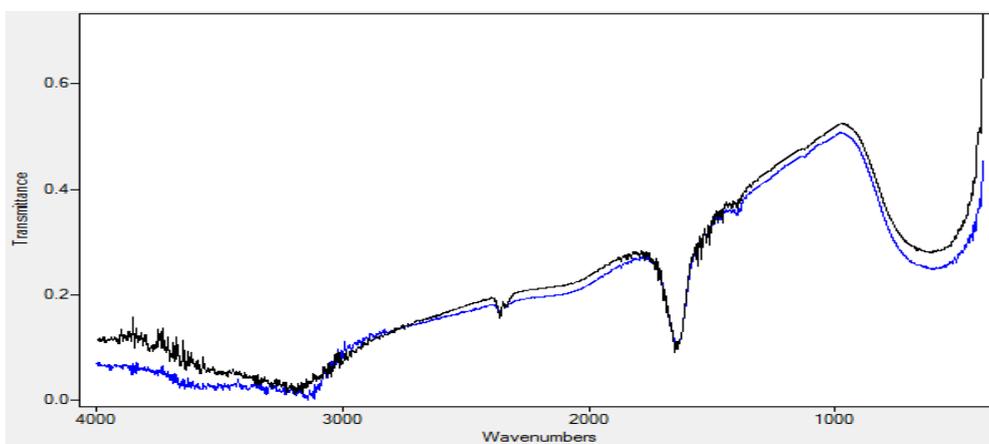


Figure 34 : spectre infra rouge de décocté des racines d'*I. viscosa*.

Tableau 18 : illustration des liaisons chimiques de décocté des racines d'*I. viscosa*

	Banda(c m-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Région 1	1641,07	C=C	Cétone	Forte	Elongation
Région 2	2359,56	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2336,28	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1644,40	C=C	Cétones	Forte	Elongation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une forte liaison chimique de type Cétones (C=C) pour les deux régions. et deux autre faible liaisons chimique au niveaux de la deuxième région de type alcool (O-H).

- **Infusé de la partie aérienne poudre**

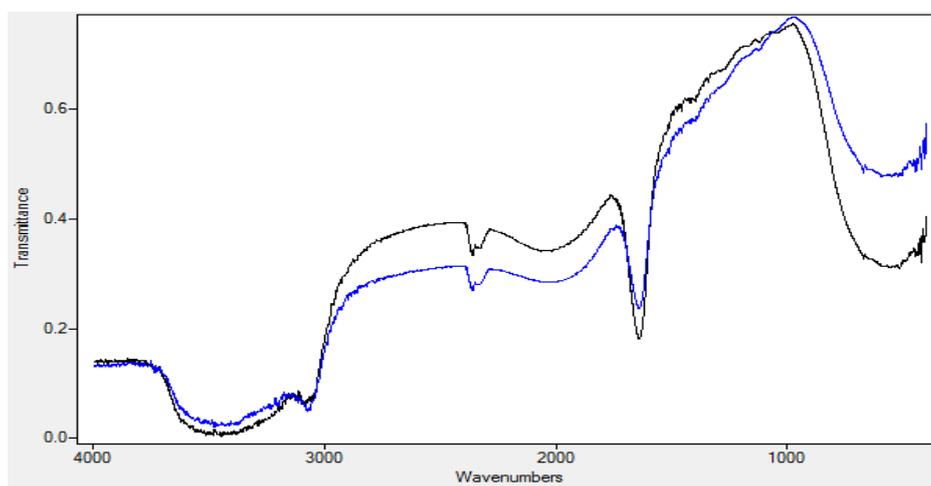


Figure 35: spectre infra rouge chimiques de infusé de la partie aérienne poudre d'*I. viscosa*

Tableau 19: illustration des liaisons chimiques de infusé de la partie aérienne poudre d'*I. viscosa*

	Banda(cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Région 1 et Région 2	2362,09	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2319,65	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1637,75	C=C	Cétones	Forte	Elongation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une similarité des liaisons chimique présentes dans de l'infusé de la partie aérienne (en poudre) entre les deux régions, une forte de type cétones (C-C) et deux autres faibles de type alcool (O-H).

- Décocté de la partie aérienne poudre

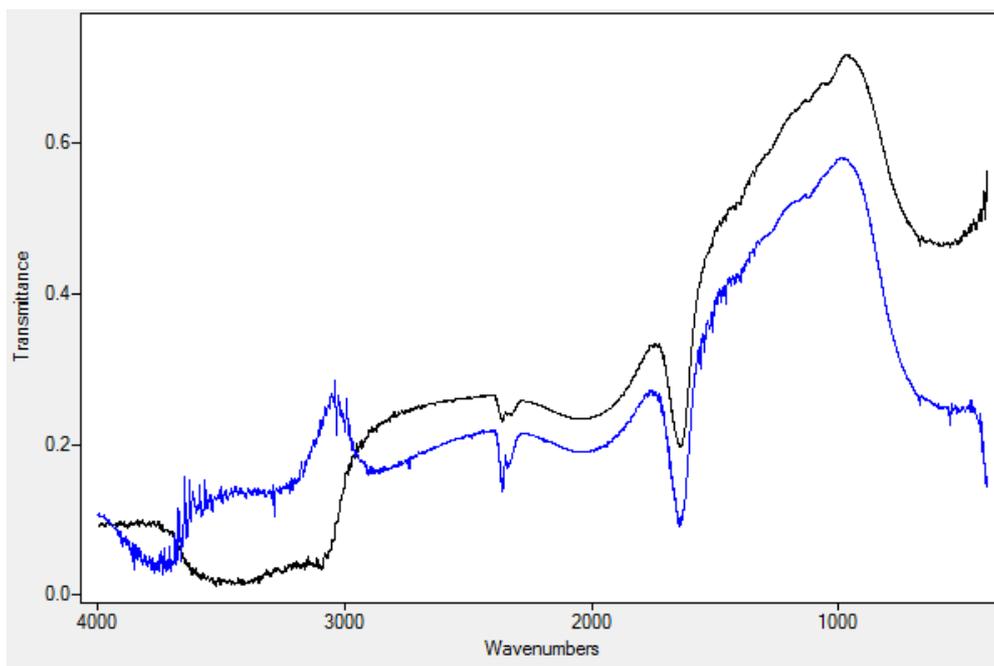


Figure 36 : spectre infra rouge de décocté de la partie aérienne poudre d'*I. viscosa*

Tableau 20 : illustration des liaisons chimiques de décocté de la partie aérienne (en poudre) d'*I. viscosa*

	Banda (cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Région 1 et Région 2	2359,56	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	2332,95	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1641,07	C=C	Cétones	Forte	Elongation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une similarité des liaisons chimique présentes dans de décocté de la partie aérienne poudre entre les deux régions, une forte de type cétones (C-C) et deux autre faible de type alcool (O-H).

• **Extrait brut méthanolique de la partie aérienne poudre**

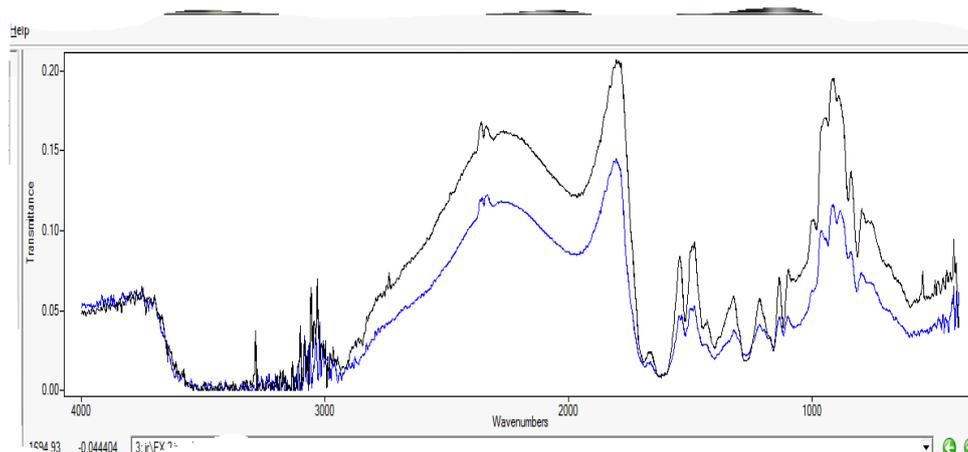


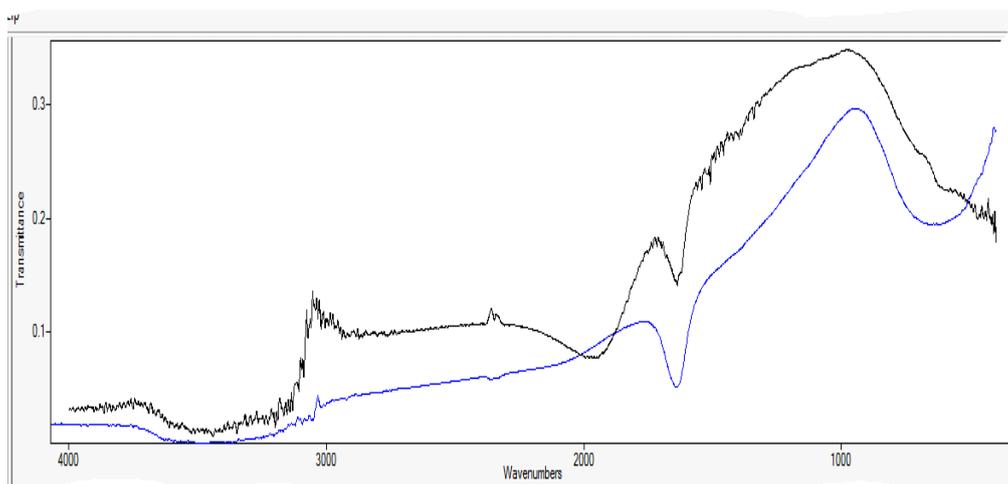
Figure 37 : spectre infra rouge d'extrait brut hydro-méthanolique de la partie aérienne (en poudre) d'*I. viscosa*

Tableau 21 : illustration des liaisons chimiques d'extrait brut méthanolique de la partie aérienne poudre d'*I. viscosa*

Banda(cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration	
Région 1 et Région 2	2350.39	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1962.46	C=C	céton	Forte	Elongation
	1701.62	C=O	Aldéhydes et Cétones	Forte	Elongation
	1614.67	C=O	Cétones	Forte	Elongation
	1521.03	C=O	Aldéhydes et Cétones	Forte	Elongation
	1450.81	CH3	Tétraédrique	Forte	Deformation
	1379.30	CH3	Tétraédrique	Forte	Deformation
	1266.88	CH3	Tétraédrique	Forte	Deformation
	1159.86	C-O	Alcools tertiaire	Forte	Elongation
	1116.39	C-O	Alcools secondaires	Forte	Elongation
	985.966	=C-H et =CH2	Alcènes	Moyenne	Elongation
	945.836	=C-H et =CH2	Alcènes	Moyenne	Elongation
	900.361	C-O-C	Éthers	Moyenne	Deformation
	850.543	C-O-C	Éthers	Moyenne	Deformation
	822.101	C-O-C	Éthers	Moyenne	Deformation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une similarité des liaisons chimique présentes dans de l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne poudre entre les deux régions

- **Caractérisation spectroscopique de l'Huile essentielle**



Bleu : région 1, Noir : région 2

Figure 38: spectre infra rouge d'huile essentielle d'*I. viscosa*.

Tableau 22 : illustration des liaisons chimiques d'huile essentielle d'*I. viscosa*

	Banda(cm-1)	Liaison	Classes fonctionnelles	Intensité	Type de vibration
Région 1	1637,75	C=C	Cétones	Forte	Elongation
Région 2	2350.39	O-H	Alcool	Forte	Elongation
	1959.12	C=C	Alcènes	Forte	Elongation
	1638.08	C=C	Cétones	Forte	Elongation

III.4.4.1. Interprétation

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une forte liaison chimique de type Cétones (C=C) pour les 2 régions, et la présence de deux liaisons chimique forte de type alcool (O-H) et de type alcènes (C=C).

D'après le tableau et les spectres IR, on a révélé la présence d'une certaine similarité entre les extrais par rapport a le positionnement des piques 'bandes' ce qui traduit par la présence des liaisons chimiques d'une même fonction.

Une forte liaison chimique de type Cétones (C=C) pour les 2 régions dans tous les extraits étudié et même dans huile essentielles qui ont une bande qui varier entre (1614.67/ 1637.75/ 1638.08/1641,07/1647.72 cm-1)

Une faible liaison chimique de type alcool (O-H) dans de l'infusé de la partie aérienne fraîche et poudre et dans décocté de la partie aérienne poudre des deux régions et Décocte de la partie aérienne fraîche de la premier région et le décocté des racines de la deuxième région qui sont une bande entre (2319,65/2326.30 2332,95 //2336,28/ 2366,22 cm-1)

Une autre faible liaison chimique de type alcool (O-H) qui est présente dans une bande entre (2350.39/ 2359,56 / 2362.89 cm-1) qui est présent dans tous les extraits a pare dans l'infusé de racine et le Décocte de la partie aérienne fraîche dans les deux régions et dans le décocté des racines de la premier région.

Une liaison chimique de type cétones (C=C) qui est présente dans une bande entre (1962.46 / 1959.12 cm-1) qui sont présent dan huile essentielle et l'extrait brut méthanolique.

Ce qui nous permet de proposer une structure de conjugaison étendue, peut être une forme proche d'hydroxyle et carboxyle relative aux flavonoïdes et aux polyphénols (Zarrou, 2012)

III.4.4.2. Analyses spectrale

Après le passage d'un millimètre des diffères extraits brut et d'HE d'*Inula viscosa* dans le spectre d'infrarouge. Les résultats sont exprimés par des spectres.

Le spectre IR a relevé plusieurs bonds dans les max sont :

Entre 3600-3200 qui signifie la liaison OH avec intensité forte qui exprime un groupes caractéristique hydroxylique.

Entre 3400-2400 qui signifie la liaison O-H avec intensité forte qui exprime un groupement d'acides carboxylique et la liaison C-H avec intensité moyenne qui exprime un alcènes.

Vers 2300 qui signifie la liaison O-H avec intensité forte qui exprime un groupement d'acides carboxylique.

Entre 1750-1500 qui signifie la liaison de nature C=O avec intensité forte qui exprime un groupe caractéristique Cétonique s'il est lié avec le Carbone ou une fonction Aldéhyde s'il est lié avec Hydrogène ou un d'acides carboxylique s'il est lié avec un OH .

Entre 1450-1050 qui signifie une liaison de nature C-O avec intensité forte qui exprime un groupe caractéristique Carbonyle avec une seule liaison.

Entre 990-910 qui signifie une liaison de nature CH et CH₂ avec intensité moyenne qui exprime un groupe d'Alcènes.

Entre 950-810 qui signifie une liaison de nature C-O-C avec intensité moyenne qui exprime un groupement Éthérique.

III.5. Activités biologiques

III.5.1. Activité antioxydante

Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait brut d'*Inula viscosa* des deux régions

Dans ce travail, nous avons testé l'extrait brut d'*Inula viscosa* des deux régions par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. En mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits. Cette méthode présente plusieurs avantages du fait qu'elle est simple, rapide et disponible. De même, l'avantage d'employer ce test est dû à la grande stabilité du radical DPPH et sa forme commerciale est prête à l'emploi (Wu, 2009). L'extrait d'*Inula viscosa* des deux régions a montré une activité antioxydante proportionnelle avec ces concentrations.

Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH. La (IC50) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (sur la courbe) (Huang, 2009).

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant:

Tableau 23 : valeurs d'IC50 des extraits bruts et d'acide ascorbique.

Extrait brut	IC50 (mg/ml)
Région 1 Hammedi	2,6151
Région2 Benyounes	2,9823
Acide ascorbique	0.2561

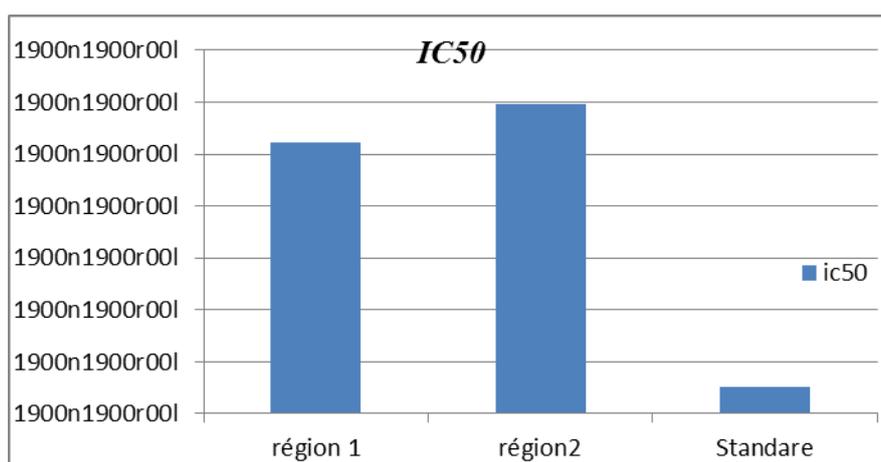


Figure 39: la concentration (IC50) d'extrait brut d'*Inula viscosa* des deux régions et d'acide ascorbique qui inhibent 50 % du radical

D'après les résultats présentés dans la (figure 40) l'extrait brut des deux régions possèdent une activité anti-radicalaire supérieur à celle du standard, avec des valeurs de la IC50 de 2,6151 ; 2,9823 et 0.2561 respectivement au Hammedi, Benyounes et de l'acide ascorbique.

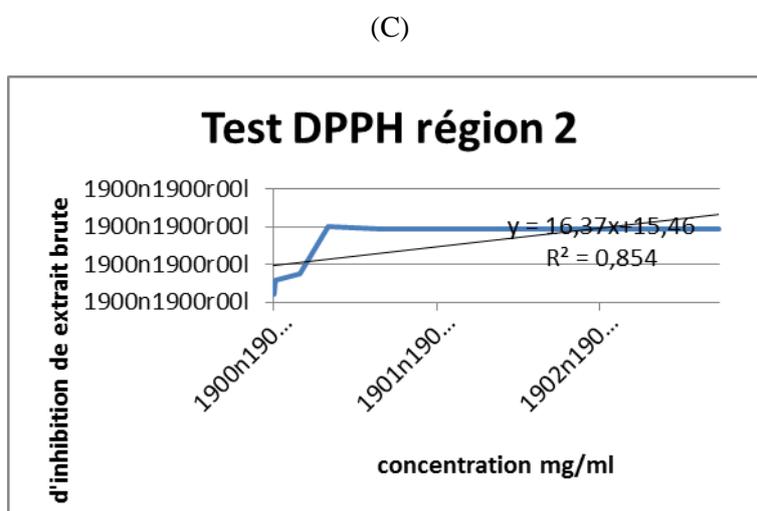
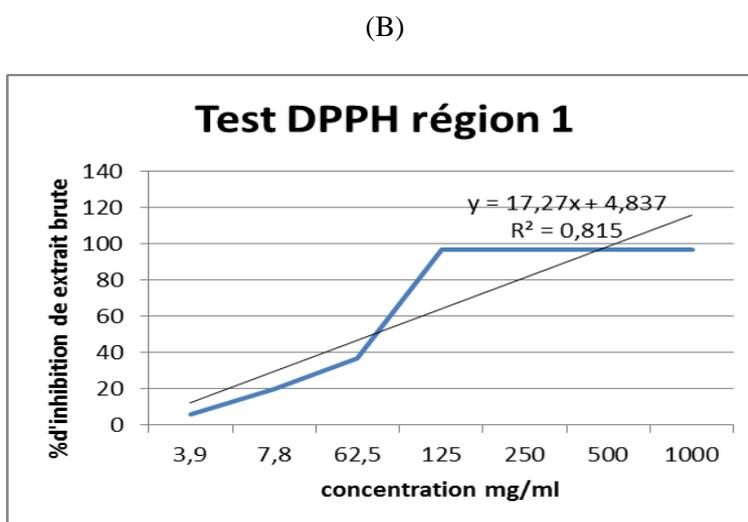
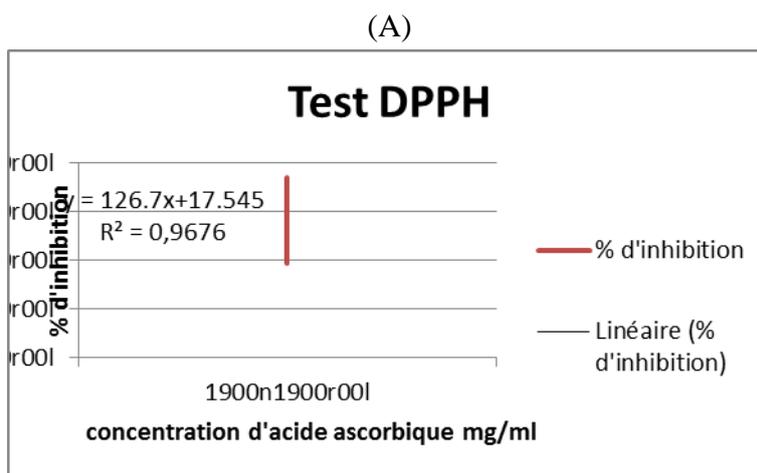


Figure 40 : pourcentage d'inhibition des radicaux libre par DPPH

(A) pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique (standard); (B) pourcentage d'inhibition de l'extrait brute d'*Inula viscosa* de la région de Hammedi ; (C) pourcentage d'inhibition de l'extrait brute de la région de Benyounes.

III.5.2. Activité antibactérienne

➤ III.5.2.1 Antibiogramme

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits expliquent les variations de leurs compositions chimiques.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Pouce *et al.*, 2003)

- souche résistante ($D < 7$ mm)
- souche sensible (8mm d Dd 14mm)
- souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

Les résultats exprimés dans les tableaux et les figures suivants montrent des degrés de sensibilités différentes des souches bactériennes étudiées vis-à-vis les extraits étudiés.

III.5.2.1.1. Extrait hydro alcoolique fraîche 5%

Tableau 24: diamètre des zones d'inhibition (mm) de macérat hydro alcoolique (5%) de la partie aérienne fraîche d' *Inula viscosa* des deux région sur la croissances des souches testées.

Benyounes			Hammedi			Région de récolte
1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	Souches
R	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> 84
R	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i> 25922
R	S	S	R	R	S	<i>S. aureus</i> 25923
S	S	S	R	R	S	<i>S. aureus</i> 43300
S	S	S	R	S	S	<i>E.faecalis</i> 28

R ; souche résistante ($D < 7$ mm) S: souche sensible (8 mm d Dd 14mm), T.S: souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm), ES: extrêmement sensible ($D > 20$ mm)S : sensible

• Test de sensibilité

Les résultats consignés dans le tableau ont montrés que l'extrait méthanolique à 5 % de la partie aérienne des deux régions a une moyenne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur *Entérocoques faecalis* 28, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 et une faible zone d'inhibition avec *E. coli* 84 et *E. coli* 25922.

• **Interprétation des résultats**

D'après le tableau on a montré que l'effet antibactérien du macérat hydro alcoolique à 5% de la partie aérienne fraîche d'*Inula viscosa* des deux régions contre les souches bactériennes: *E.coli 84* : une activité inhibitrice faible

E.coli 25922 : une faible activité inhibitrice

Staphylococcus aureus 25923 : une moyenne activité inhibitrice

Staphylococcus aureus 43300 : une moyenne activité inhibitrice

Entérocoques faecalis 28 : une moyenne activité inhibitrice

III.5. 2.1.2. Extrait brut de la partie aérienne en poudre (à 25%)

Tableau 25 : diamètre des zones d'inhibition (mm) d'extrait brut d'*Inula viscosa* vis à vis les souches testées.

Concentration des extraits		Région de récolte							
		Hammedi				Benyounes			
		SM	1/2	1/4	1/8	SM	1/2	1/4	1/8
Souches bactériennes	<i>E. coli 84</i>	S	S	S	S	S	HS	S	S
	<i>E.coli 25922</i>	S	HS	S	S	S	S	S	S
	<i>S.aureus 25923</i>	HS	HS	HS	S	S	HS	S	S
	<i>S.aureus 43300</i>	HS	S	S	S	S	HS	HS	S
	<i>E.faecalis 28</i>	HS	HS	HS	HS	S	HS	HS	S

SM : Solution mère , S : sensible ; HS : hautement sensible

• **Test de sensibilité**

Les résultats consignés dans le tableau 1 et 2 ont montré que l'extrait brut à 25 % de la partie aérienne des deux régions (hammedi et benyounes) a une excellente activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur *Staphylococcus aureus*, et une bonne activité inhibitrice sur et *E.coli 25922* , *Staphylococcus aureus 43300* et *Entérocoques faecalis 28*. Et une moyenne activité inhibitrice sur *E.coli*

Interprétation des résultats

D'après le tableau 2 on remarque que l'extrait brut 25% de la partie aérienne réduit en poudre d'*Inula viscosa* des deux régions montre un effet antibactérien contre les souches :

E.coli 84 : Une moyenne activité inhibitrice

E.coli 25922 : Une bonne activité inhibitrice

Staphylococcus aureus 25923 : Une excellente activité inhibitrice

Staphylococcus aureus 43300 : Une bonne activité inhibitrice

Entérocoques faecalis 28 : Une bonne activité inhibitrice

Interprétation des résultats

Les deux extraits des régions différents ont réagit positivement au moins sur les souches microbiennes testées, ce qui confirme que la plante *d'Inula viscosa* est douée de propriété antibactérienne très appréciés.

En effet, la comparaison des deux régions Hammedi, Benyounes nous révéle que l'extrait brut des deux régions est plus active sur *S.aureus* 25923 *S.aureus* 43300 et *Entérocoques faecalis* 28. Et une absence ou faible activité sur *E.coli* 84 et *E.coli*25922 (varie selon la dose d'extrait hydro-méthanolique).

II.5.2.2. Antibiogramme

La comparaison quantitative et qualitative des résultats de l'extrait et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparables (Lozniewski et Rabaud, 2010) . On peut tous de même risquer à une comparaison globale de l'activité des antibiotiques avec celle des extraits végétaux. Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisés sur les cinq souches cibles sont représentées dans le tableau 26

Tableau 26: diamètre des zones d'inhibition (mm) des antibiotiques sur la croissance des souches testées.

Souche	Antibiotique				
	SP (100ug)	CM (2ug)	C (30ug)	VA (30ug)	CS (50ug)
<i>Escherichia coli</i> 84	+++	+++	++	++	+
<i>Escherichia coli</i> 25922	++++	++++	+++	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	+++	+++	++	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	+++	+++	++	++	+
<i>Entérocoques faecalis</i> 28	+++	++++	++++	+	+

CS :colistin,VA :Vantamicin, C : Chlorophinicol ,CM : Cilindamycin ,SP :Spyramicin

10-15mm (+) ; 15-20 mm (++) ; 20-25mm (+++) ; 25-30mm (++++)

On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés (tableau 26).

Pour l'extrait méthanolique (fraiche), l'activité antibactérienne est inférieure à celle des antibiotiques. Et pour l'extrait brut hydro-méthanolique (poudre), l'activité antibactérienne est supérieure à celle des antibiotiques.

Cet extrait est globalement meilleur que les antibiotiques testés sauf quelques exceptions sur (*E. coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 et *Entérocoques* 28)

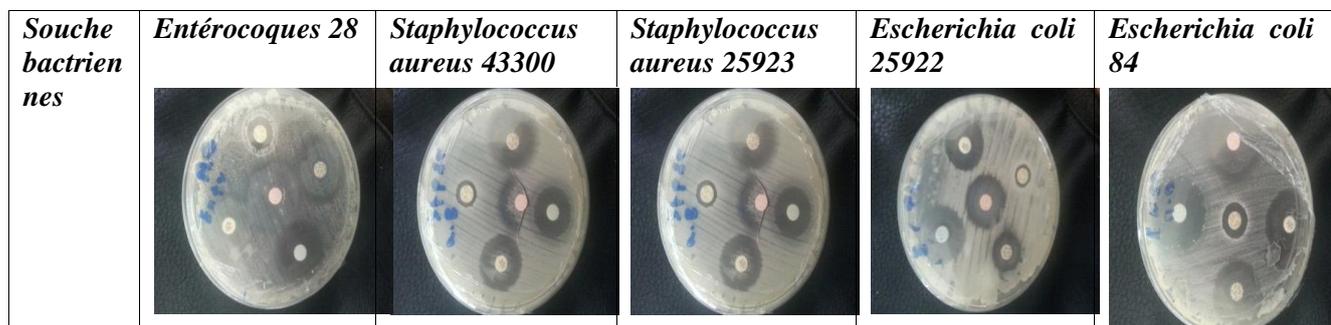


Figure 41 : les résultats de l'antibiogramme

Qualification de l'action antibactérienne des extraits étudiés

Un prélèvement sur la surface de la gélose montre un développement lorsqu'il est repiqué. Nos en déduisons que la zone est stérile et que l'effet pour ces extraits est bactériostatique.

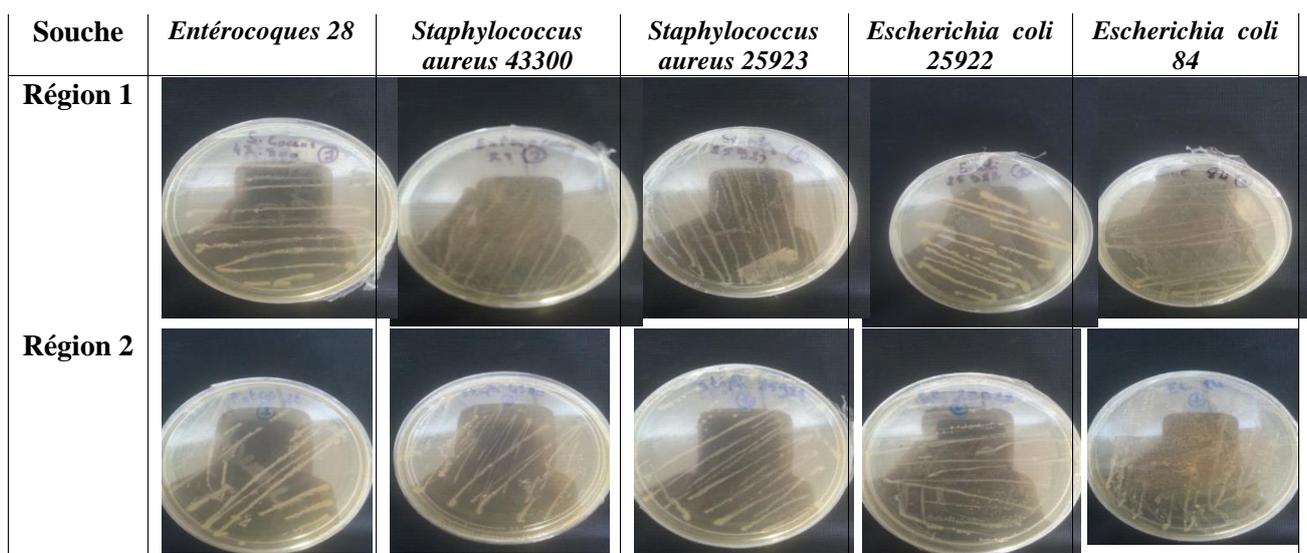


Figure 42 : développement des colonies prélevées à partir de la zone d'inhibition d'extrait hydro alcoolique 5%.

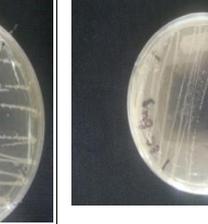
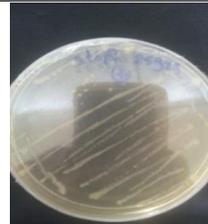
Souches	<i>Entérocoques</i> 28	<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Escherichia coli</i> 84
Région 1					
Région 2					

Figure 43 : développement des colonies prélevé a partir de la zone d'inhibition d'extrait brut 25%

III.6. Discussions

III.6.1. Teneur en eau

Benguerba (2008) souligne un taux d'humidité important de l'inule visqueuse compris entre 56 à 82%. Ainsi que, Kheyar (2009) a souligné une Teneur en eau de 81.66% dans l'inule de Tichy (Bejaia). Tandis que, nos résultats sont proche à ces travaux avec un taux d'humidité d'environ 79% (Hammedi) et 69% (Benyounes). Cette différence peut être liée aux factures climatiques du milieu et moment de récolte (Abdoune, 2012). En outre, peut être due aux conditions exogènes abiotique (climats, sol, ...) où la plante se trouve au bord de route cherche de l'eau pour assurer sa croissance et sa survie.

III.6.2. Test phytochimique

L'étude phytochimique de la plante *Inula viscosa* des deux régions étudiées à montré une richesse et une diversité moléculaire en métabolites primaires et secondaires.

Une variation chimique moléculaire s'installe pour *I. viscosa* des les deux régions. Cela peut-être traduit par une différence dans la texture et la composition de sole des deux régions étudié et a l'influence des conditions climatiques sur la composition chimique du plant.

III.6.3. Huile essentielle

Nos résultats montrent un rendement en HE inférieure a celle trouvé par de Side Larbi (2016) qui de l'ordre 1,49% par hydrodistillation (Clevenger, 1928) utilisant les feuilles de l'inule récoltées à Chorfa (Daïra de Sig), Wilaya de Mascara durant la période Octobre - Décembre. Cette Wilaya de Mascara située à une altitude de 161 mètres, une latitude de 35° 25' 55" Nord et une longitude de 0° 14' 43" Ouest. Cette déférence pourrait être due au période de la récolte de la plante, la partie utilisée pour l'extraction et où mode d'extraction réalisée.

Le temps maximal de l'extraction d'HE d'*Inula viscosa* par hydrodistillation (Clevenger, 1928) est de 3H, et en accord avec plusieurs auteurs tel que Side Larbi (2016).

III.6.4. Rendement en polyphénols totaux

En comparant notre résultat avec ceux de Derbal et Fedali (2015) ayant travaillées sur la même espèce, nous remarquons que le rendement de notre échantillons est très proche a leur rendement d'extraction qui sont de l'ordre 7, 20 %.

Le rendement de l'extrait méthanolique brut obtenu pour les deux régions de collecte est proche rapprochent avec 3,22 % et 4,39% respectivement a Hammedi et Benyounes.

Par contre, Chahmi et al. (2015) dénote un rendement de l'ordre 23.90%, 20,08% 13.35%. Chez la même espèce, originaire de trois régions marocaines. Nous remarquons que le rendement de notre échantillons est largement inférieure à celle de Maroc ce qui peut être expliqué par la nature des régions étudiés (sol, climat, température,...).

La comparaison des différents rendements fait ressortir la richesse de notre plante en composés bioactifs phénoliques.

En effet, le rendement n'est pas relatif, il dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été faite. Autrement, cette différence peut être due à la nature de la matière végétale (Smith et al., 2001). Elle varie en fonction de l'organe récolté ; de la période ainsi qu'au mode de la récolte. Elle est liée aussi aux facteurs édaphoclimatiques de milieu (altitude, latitude, type de sol et pluviométrie). Le mode de stockage et le conditionnement influent aussi sur le rendement (Lee et al., 2003).

On comparant nos résultats avec ceux obtenus par Khalil et al. (2007) et Benyahia (2014), sur les feuilles de la même espèce récoltées dans la région de Tlemcen en mois de novembre, il ressort que les composants de cette plante présentent des similitudes pour certains composés et dissimilitudes pour d'autres. Ceci est du probablement à une biodiversité moléculaire résultante d'un changement de l'environnement. Ces différences peuvent être également expliquées par l'âge des plantes au moment de la récolte. En effet, Ghesten et al. (2001) confirment que les tanins s'accumulent fréquemment dans les organes âgés. La saison de récolte ainsi que le climat peuvent aussi influencer sur la teneur des plantes en substance bioactifs.

III.6.5. Discussion de l'analyse quantitative

III.6.5.1. Discussion de dosage de polyphénol

Dans cette étude, un taux élevé de polyphénol a été révélé par le macérat hydrique des feuilles fraîche par rapport à celle trouvée par Derbal et al, 2015 avec le macéra hydrique de la plante sèche qui est de l'ordre de 174.51 mg EAG/g sec

Pareillement au rendement, la différence des teneurs peut donc être expliquée par les conditions environnementales, la période de récolte ainsi que les protocoles expérimentaux (Lee et al., 2003 ; Smith et al., 2005).

L'extraction est une étape préliminaire très importante avant l'analyse quantitative et qualitative des polyphénols, particulièrement, ce dosage dépend fortement des procédés d'extractions utilisés. Plusieurs facteurs influent sur la teneur en composés phénoliques. A titre d'exemple, on cite la méthode de purification, la nature du solvant, la température et le pH du milieu d'extraction (Chikhi, 2014).

Par la suite, il était intéressant d'identifier les différents composés phénoliques présents dans les extraits testés dans les futurs travaux.

III.6.5.2. Discussion de dosage des flavonoïdes

Notre étude montre un taux important des flavonoïdes présenté dans le macéra hydrique des feuilles fraîche est beaucoup plus faible à celle trouver dans le travail Derbal et al. (2015) qui est de l'ordre $6,46 \pm 0,25$ mg EqQ/g MS et le travail de Side Larbi et al., (2015) qui est de l'ordre de $49,19 \pm 0,39$ mg EqQ/g d'où ils sont utilisés le macéra hydrique de la plante sèche.

la différence des teneurs peut donc être expliquée par les conditions environnementales, la période de récolte ainsi que les protocoles expérimentaux (Lee *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2005).

III.6.6. Activités biologiques

III.6.6.1. Antioxydante

Nos résultats concordent avec les travaux de (Chahmi *et al.*, 2015) en provenance de Maroc, a démontre que l'espèce *Inula viscosa* possèdent une activité anti-radicalaire plus proche à celle du BTH et VC (l'extrait ethanologique 0,18g/l) (Tsai, 2009).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation Structurale de l'antioxydant (Molyneux, 2004; Tsimogiannis and Oreopoulou, 2004).

Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997).

Cette activité peut être due aux flavonoides où aux polyphénols présentés dans nos extrais hydro-méthanolique (Mau, 2009).

III.6.6.2. Antibactérienne

L'accroissement des infections bactériennes, notamment celles qui sont dues au développement des souches résistantes au médicament utilisé soulignent la nécessité de la découverte de nouveaux agents antibactériens (Remmal et Bouchkhi, 1993).

Dans cette partie, nous avons évalué l'activité antimicrobienne *in vitro* de macérat hydro alcoolique a 5% et de l'extrait brut d'*Inula viscosa* des deux région sur cinq souches bactériennes *E.coli* 84 , *E.coli* 25922 ,*S. aureus* 25923 , *S. aureus* 43300 et *E.faecalis* 28.

Le solvant méthanol utilisé comme témoin, n'exerce aucun effet sur les souches microbiennes testées.

On comparant notre résultats avec Ramli (2013), où il dénote l'absence d'une zone d'inhibition pour l'extrait méthanol/eau obtenu par lixiviation contre *Escherichia coli*, donc cette bactérie est résistante aux substances végétales contenues dans la plante *Inula viscosa*.

D'après Meziane (2009), cette plante a un effet légèrement inhibiteur sur *E.coli* et fortement sur *Staphylococcus aureus*.

Mohammdi, (2013) indique que la plupart des souches bactériennes on montre une résistance vis-à-vis les antibiotiques.

Aussi les résultats de cette étude (sensibilités des souches Gram+ et résistante pour les Gram-) corroborent ceux (Cosentino et Tuberoso, 1999, De-Billerbeck, 2002) ; ils confirment que les bactéries Gram positif sont plus sensibles que celle de Gram négatif; ceci peut être explique par la différence de la structure de la paroi constituant les différentes bactéries Gram + et Gram-.

La paroi est dotée d'une membrane externe, car la présence d'une couche de lipopolysaccharide LPS qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule Zaika (1988), et Ali Shtayeh *et al.* (1988).

L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs.

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Dorman et Deans, 2000).

La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antibactérienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

Cette activité est en relation avec la nature de l'extrait (fraîche et sèche), la nature de solvant et la souche bactérienne testée, et les conditions climatiques. (Dean et Ritchie, 1987).

Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs années. Ils sont toujours des sources essentielles de médicaments. ce présent travail porte sur l'étude anatomique, phytochimique, analyse spectroscopique par infrarouge ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne des composés bioactifs présent dans l'extrait aqueux et hydro alcoolique brut d'*Inula viscosa* des deux régions de collecte : Hammedi et Benyounes (welaya de Boumerdes).

Les résultats de taux de rendement de matériel sec montrent des valeurs proches ; elles sont de 21% et 31% pour les deux régions

L'étude anatomique d'*Inula viscosa* (feuille, tige et racine) à permet de déterminer la présence d'une organisation tissulaires bien appropriés pour chaque organe. Notons la présence de tissu de revêtement, de tissu de soutien, tissu conducteur primaire pour tige et feuille (phloème et xylème) et secondaires pour la racine (liber et bois hétéroxylé), tissu sécréteur et le plus volumineux tissu de remplissage (parenchyme lacuneux au niveau de la tige et la racine). De plus, des produits de sécrétions de couleur marron ont révélés dans la partie corticale de la racine, qui pourrait être des polyphénols. Des poiles sécréteurs et tecteurs sont hautement disposés sur l'épiderme de la feuille et de la tige.

L'étude phytochimique de partie aérienne d'*Inula viscosa* a mis en évidence les mêmes compositions chimiques pour les deux régions de collecte. En effet elle est très riche en tanins totaux en tanins galliques et en saponosides. Cependant les mucilages sont importantes à Hammedi et moins à Benyounes ce qui pourrait être liée en fonction de l'humidité.

L'étude phytochimique de la poudre d'*Inula viscosa* a mis en évidence les mêmes compositions chimiques pour les deux régions de collecte. En effet elle riche en tanins totaux en tanins galliquet en mucilages en flavonoïdes en saponosides et en sucre réducteuret absence d'amidon en coumarines en quinones libres en alcaoides en carotinoïdes en irridoides en anthocyanes et en tanins catéchiniques

L'étude spectroscopique par IR, nous a permet de proposer une structure de conjugaison étendue, peut être une forme proche de hydroxyle et carboxyle relative aux flavonoïdes et aux polyphénols.

L'étude de l'activité antioxydant est réalisées par le test de piégeage du radical libre DPPH montre une bonne activité antioxydant pour l'extrait brut d'*Inula viscosa* avec une IC 50 supérieur à celle de standard IC50 0.25 mg/ml pour les deux régions hammedi IC50 2,61mg/ml et benyounes IC50 2,98 mg/ml.

L'étude de l'activité antimicrobienne réalisée par la méthode des disques et de diffusion sur gel montre un effet bactériostatique pour l'extrait hydro-alcoolique de la partie aérienne fraîche et sèche (brut) d'*Inula viscosa* des deux régions. En outre, un bon effet inhibiteur à été enregistré sur les souches bactériennes de Gram+ genre *Staphylococcus aureus* 23 ± 2.65 et *Entérocoques faecalis* $18,67 \pm 1.15$.

Et un faible effet inhibiteur à été enregistré sur les souches bactériennes de Gram+ genre *Escherichia coli* $14,66 \pm 2,51$. On déduit que notre extrais est bactériostatique.

Perspectives

Ce travail reste préliminaire. Il serait beaucoup plus intéressant de compléter ce travail par une suite expérimentale indispensable basée sur les axes suivants :

- Caractérisation des constituants de cette plante par des méthodes analytique plus performants comme HPLC, GC-SM et le RMN.
- Tester d'autres méthodes d'extraction et évaluer le rendement de substances obtenues.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait sur plusieurs agents pathogènes (virus, bactéries, parasites, et champignons...)
- Analyser la toxicité des substances bioactives sur des animaux afin de déterminer la dose létale DL50.

Confirmer par des tests «in vivo» l'intérêt thérapeutique.

- A -

Abdalla.S.,Abu-Zerga.M.,Afidif.,1988-Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inulaviscosa*, on isolated.Gem. Pharmacol. n°4 : 63p.

Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., Agric J., 1998-Food Chem, Vol 46:1739-1745.

Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg, T., 1996-Advances in development of pharmaceutical antioxidants.*Adv. Drug. Res*, 28 : 65-180.

Ardestani A., Yazdanparast R., 2007-Flavonoids as potential therapeutic agents for type 1 diabetes. *Medical hypotheses* ,69(4):955

Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P., 2005- Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*; 89 : 27–36.

AthamenaS., ChalghemI., Kassah-LaouarA., LarouiS., KhebriS., 2010-Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminumcyminum L.* *Lebanese Science Journal.* Vol 11 (1):72p

- B -

BachelotC., Blaise A., Corbel T., Guernic A., 2005- Les huilesessentielles. Licence en Biologie, U.C.O Bretag

Bahorun T., Gressier B., Troitin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M., 1996- Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei.Forschung.* 46: 1086-1089.

Bekele J. and Hassanali A.,2001- Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimumkilimandscharicum*and *Ocimumkenyense*(Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry*, 57 : 385 – 391.

Bekkara F.A; Benhammou1N and TatjanaKadifkovaPanovska T.K.,2008- biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *inula viscose* from the tlemcen region of algeria; 30 – no 3.sci.

Belaiche P., 1979- Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.p 123.

Benayache. S., Banayache .F., Dendoughi.H., JAY.M., 1991- Les Favomoïdesde *Inulaviscosa L.* Plantes médicinales et phytothérapie. Tome 25, n° 4 .p 170-176.

Références bibliographiques

Benbrinis S., 2012- Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolinachamaecyparissus*. Thèse de Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. 84p.

BenbrookM., 2005- Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed.Theorganic center : 6-8.

Bimakr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M., 2011- Comparison of different extraction method of major bioactive flavonoidcompounds from spearmint (*MenthaspicataL.*) leaves, *Food and Bioproducts Processing*, 89,67- 72.

Bliefert, C., Perraud, R., 2001- Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets. De BoeckUniversité.

Bondet V; Williams W.B and Berset C., 1997- Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaftund Technologie* **30**, 609-615.

Bougandoura N., Bendimerad N., 2013- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Saturejacalaminthassp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*. (9): 15p.

Bouزيد S., 2016 - Cours de Biologie Vegetale .Université Des Frères MentouriConstantine.P12.

Bravo L., 1998- *Nutrition Review*. 56:317–333.

Bruneton. J, 1993- *Pharmacognosie – Phytochimie et plantes médicinales*.2ème édition Lavoisier–Parisi,363-474p.

Bruneton J., 1999- *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.P 54.

Bssaibis F., Gmira N. et Meziane M., 2009- Activité antibactérienne de *Dittrichiaviscosa* W. Greuter .*Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 3, N° 1. PP 44-45. ne Nord, 27 p.

- C -

Cafarchia. C., DE. Laurentism, Mililloma- Puccimi. Y.,1999- Recherche of antifungal activity of flowers and leaves of *Inula viscosa*.*Parasitologia*. 82p.

Careri M., Elveri L., Mangia A., Musci M., 2001- Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, *Journal of Chromatography A*, 881, 449-460.

Références bibliographiques

Chemat S., Lagha A., Aitamar H., Bartels P.V., Chemat F., 2004- Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 188-195.

Chiarlo. B., 1988- Sui costituenti dell Inulaviscosa Ait.Bull. Chim.Farm.n° 107. pp 370-380.

Chikhi I., 2014- Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatique et médicinales de l'ouest d'Algérie. Université Aboulébelkaid, telemcen ,p98.

Chuah A.M., Lee Y.C., Yamaguchi T., Yakamura H., Yin L.J., Matoba T., 2008- Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111:20-28.

Cafarchia C., De Laurientis N., Milillo M.A., Losacco V., Puccini V., 2002- *Parassitologia*. 44:153.

Clardy J and Walsh C., 2004- Lessons from natural molecules. *Nature*. 432: 829-837.

Cosentino S. Et Tuberoso C. I. G., 1999- In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Let Appl Microbiol*, 29(2): 130- 135.

Cox P.A., 1994- The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Found Symp*. 185, 25-36; *discussion* 36-41.

Cuoco G., Mathe C., Archier P., Chemat F., Vieillescazes C., 2009- A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection, *Ultrasonics Sonochemistry*, **16**, 75-82.

- D -

Daels-rakotoarison D., 1999- Extraits polyphénoliques d'aubépine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 -64.

Dean F M., 1963- Natural occurring Oxygen Ring Compounds, Butterworths. Londres. P225-228.

Deans S. G. et Ritchie G., 1987- Antimicrobial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 162-180.

Delvare G. et Aberlenc H.P., 1986- Les insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale. P112-115.

Derbal N. et Fedali H., 2015- L'activité antioxydante, anti inflammatoire et analgésique de plante médicinale Algérienne *Inula .Viscosa* ; Université des Frères Mentouri Constantine ,P40.

Djeridane, A ., Boussoussa, H., Khacheba, I., 2006- Comparaison des teneurs phénoliques totales et des activités antioxydantes de Feuille de curcuma, flange de pandan et fleur de gingembre, 417-423.

Références bibliographiques

Dorman H.J.D., 2000- Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*. 88-308-316.

- E-

Ebenguerba A., 2008- Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece *inulacrithmoides l*. université mémoire magister universite mentouri constantine.

El-demerdash F.M., Youcef M.I., Zoheir M.A., 2005- Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: Antioxidant role of vitamin C., *Food Chem., Toxicol.* ; 43:1743-1752.

Enan E., 2000- Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*. Vol130 (3) Nov2001, p 325-337.

Enan E.E., 2005- Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol35(4) p 309-321.

Esau, K., 1965- Plant Anatomy. Wiley, J. & Sons eds., New York, Second Edition, 767 p.

Escarpa A., Gonzalez M.C., 1998- High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A*, p 823, 331 -337.

- F-

Favier A., 2003- Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Fauron.R., Moati.R. et Donadieu.Y., 1983- *Guide pratique de phytothérapie*. Ed. MALOINE. 811 p.

Félix TOMI ; Dr. Pascale Bradesi, 2010- Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats, universite de corse pascal paolifaculte des sciences et techniques.

Fournier P., 1947- *Livre des plantes médicinales et veneneuses de France*. Ed. Le chevalier. Tome 1 p 176-178.

-G-

Gausson H., et Leroy H. F., 1982- Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2ème Ed : Masson. Paris. 426 p.

Références bibliographiques

Georgieva S., Boyadzhiev L., Angelov G., 2010- Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Revue de génie industriel.* (5):124-132.

Ghestem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M., 2001- Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, -Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris. France. 275p.

Guignard J.L., 2000- Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, p.177-185.

-H-

Halliwell B., Gutteridge J M C., Arnoma O L., 1987- The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem.* (1): 215-219.

Hamdi Pacha Y., Benazzouz M., Belkhiri. H., 1999- Effet cicatrisant de *Lawsoniainermis* dans les brûlures du 3ème degré. *Revue Med. Pharm. Afr.* Vol 11-12 p151- 157.

Harborne, J. B. et Williams, C. A., 1972- Phytochemistry, Flavonoid pattern in the fruits of the Umbelliferae, **11**.

Haslam E., 1993- Polyphenol complexation. In "polyphenolic phenomena". Ed. Scalbert A. INRA (Paris). Chap. 2 : 23-31.

Hellal Z., 2011- *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus.* Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mém de Magi, Unive Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. Algérie. p78.

<https://fr.wikipedia.org/wiki/fr:Wilaya%20de%20Boumerd%C3%A8s?uselang=en>

-I-

Ibáñez E., López-Sebastian S., Ramos E., Tabera J., Reglero G., 1998- Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction, *Food Chemistry*, 63, 281-285.

Isman, 2000- Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19(2000) 603-608.

- J -

Justesen U., Knuthsen P., Torben L., 1998- Quantitative analysis of flavonoids, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.

Jeong S.M; Kim S.Y; Kim D.R; Jo S.C; Nam K.C; Ahn D.U et Lee S.C., 2004- Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 3389–3393.

-K-

Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., 2007- Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, **100**: 584–589.

Keane S., et Ryan MF. 1999- Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect biochemistry and molecular biology* Vol 29(12) 1097-1104.

Kouamé J., Gnoula C., Palé E., Bassolé H., Guissou I P., Simporé J., Nikiéma J B., 2009- Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guierasenegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*. Vol 32 (1 et 2) :14p.

Kumaran A et Karunakaran R.J., 2007- In vitro antioxidant activity and phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants.

-L-

Lauro. L Rolih.C., 1990- Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait. *Boletín Soc. Ital – Biol – Sper.* n°9 p 34-66.

Lee, P.J., Taylor, et R.V. Gordon., 2003- Cacao has more phenolic phytochemical and a higher antioxidant capacity than teas, and red wine, *J Agric Food chem.*, 51:7292-7295.

Lee S. E., Hyun J. H., Ha J. -S., Jeong H. S., & Kim J. H. 2003- Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, 167–179.

Léger J. F., 2007- Noms vernaculaires des taxons de la BDTFX. In : *Tela Botanica*. Fiche de Flore de *Anacyclus valentinus*. 35: 153.

Lozniewski A., Rabaud C., 2010- Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins, CCLIN, Sud-Est, Nancy, 4 p.

Lucchesi M. E., 2005- Thèse sur : Extraction sans solvant assistée par microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles Thèse de doctorat. université de la Réunion. Français. p. 56, 59.

Lucchesi M. E., 2005- Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Université de La Réunion.

Luque de Castro M.D., Priego-Capote F., 2010- Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2383-2389.

-M-

Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. 2005- Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes. P91-92.

Martin S., Tsitohaina R., 2002- Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. Vol. (51): 304-315.

Milbury P., Richer A., 2008- Understanding the Antioxidant Controversy. Ed. Praeger: 81P.

Mohammedi., 2013- Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 169 p.

Molyneux P., 2004- The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.

Molyneux, P. and Songklanakar, J., 2004- The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sciences Technology*, 26(2) :211-219.

Mukhopadhyay M., 2000- Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton, Floride: éd. CRC Press, 360 p.

-N-

Nägeli, C., 1858- Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik, Part I, Engelmann, Leipzig.

-O-

Öksüz S., 1976- Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Plantamedica*. vol 29 p 343-345.

Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R L., 2001- Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49): 4619-4626.

Oyaizu, M., 1986- Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

-P-

Paris M. et Hurabielle M., 1981- Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson. 339 p.

Pastre J., Priymenko N., 2007- Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét.* (4) :187 P.

Références bibliographiques

Ponce A. G., Fritz R., Del Valle C. et Roura S.I., 2003- Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology* (Elsevier).36: 679-684.

-Q-

Quezel. P., Santa.S, 1963- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Centre national de la recherche scientifique. Tome 2 p 218-940.

-R-

Rahal S., 2004- Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition.162 P.

Regnault Roger C., 2005- Enjeux Phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Ed Lavoisier, p : 20-43.

Remmal A., Bouchkhi T., Rhayouk., Ettaybi M et Tantouielraki., 1993- Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J.ESS.Oil Res.*5 (2).179-184.

Roulier.G., 1990- Traité pratique d'aromathérapie, propriétés et indications thérapeutiques des Essences de plantes. Ed. Dangles .p 64-65.

-S-

Sanchez-Moreno C., 2002- Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, Vol. 8, Issue: 3, pp. 121-137.

Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006- Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions *Tec & Doc*, 398 P.

Solfo R.R., 1973- Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés. Ed : O.R.S.T.O.M.40: 133.

Side Larbi K., 2016- Potentiel du contenu Polyphénolique et Huiles Essentielles de Quelques Plantes Médicinales à Activités Anticartilagineuse et Biologiques ; UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA, P66.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. Jr, 1965- Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Smith RL, Cohen SM, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, et al., 2005- A procedure for the safety evaluation of natural flavour complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry. Toxicol* 43 345-363.

Références bibliographiques

Stashenko E.E., Jaramillo B.E. et Martinez J.R., 2004- Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chroma. A.*, Vol. 1025, p : 93 – 103.

Svoboda K. P. et Hampson J. B., 1999- Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>.

-T-

Taillade C., Susplugas P., Balansard G., 1980- Les Flavonoïdes d'*Inula viscosa* Ait. Plantes médicinales et phytothérapie. Tome 14 n° p 26-28.

Tanguy M., 2009- Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine. Vol 5 (6):256-260.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat H A., Sokmen A., 2006- Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* (95) : 200-204.

Traboulsi AF, Taoubi K, El-Haj S, Bessiere JM, Rammal. 2002- Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* 2002 May;58(5):491-5.

Tsai S.-Y ; Huang S.-J ; Lo S.-H ; Wu T.-P ; Lian P.-Y ; Mau J.-L. 2009- Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chem.* 113, 578–584.

Tsimogiannis D.I and Oreopoulou V. 2004- Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 523-528.

-U-

Ulubelen. A., Goun. S., 1986- Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry*. vol 26 n° 4 p 1223-1224.

Urquiaga I. et Leighton F., 2000- Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64.

-V-

Villano D., Fernandez-Pachon MS., Moya ML., Troncoso AM., Garcia-Parilla MC., 2007- Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230–235.

Vladimir-Knežević s., Blažković B., Bival Štefan M., Alegro A., Kőszegi T., & Petrik J., 2011- antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia .meolecules, Vol.16,No.2,pp.14454-1470, ISSN 1420- 3049.

-W-

Wilson, J. R., 1993- Organization of forage plant tissues. *Dans* : Forage cell wall structure and digestibility, Jung, H. G, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, et J. Ralph *eds.*, Madison, WI 53711, USA,ASA-CSSA-SSSA., 1-32.

Phutdhawong W., KawareeR., Sanjaia S.,Sengpracha W., 2007- Microwave assisted isolation of essential oil of cinnamomum *Reinw. Ex B1..comparison with conventional hydrodistillation. Molecules, 12, 868-877.*

-Y-

Yaniz Z., Dafni A.,Friedmanj, and PalevitchD., 1987- Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J. Ethnopharmacol* vol 2 p 51-145.

YakhlefG., 2010- Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris*L. ET *Laurusnobilis*L. université el hadj lakhdar –batna– ,P41,59.

Yao K., De Luca V. and Brisson N., 1995- Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.*; 7: 1787-1799.

-Z-

ZaikaL., 1988- Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2): 97-118.

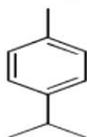
Annexe N°1

1. Terpenes

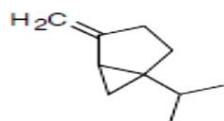
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("y") or p.cymene



Sabinene

**Carbure bicyclic**

Alpha-pinene



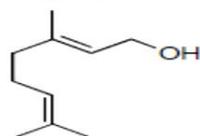
Beta-pinene

**Alcohol acyclic**

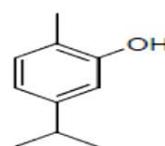
Citronellol



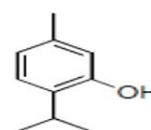
Geraniol

**Phenol**

Carvacrol



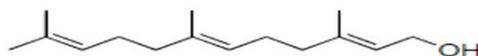
Thymol



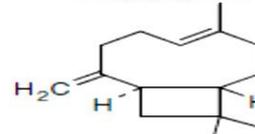
-Sesquiterpenes

Carbure

Farnesol

**Alcohol**

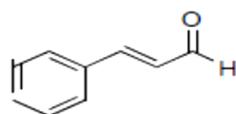
Caryophyllene



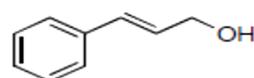
2. Aromatic compounds

Aldehyde

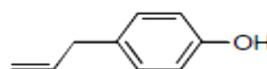
Cinnamaldehyde

**Alcohol**

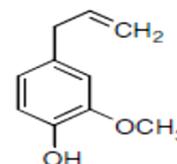
Cinnamyl alcohol

**Phenol**

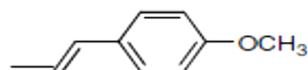
Chavicol

**Phenol**

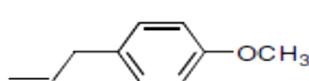
Eugenol

**Methoxy derivative**

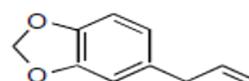
Anethole

**Methoxy derivative**

Estragole

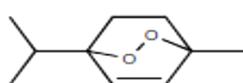
**Methylene dioxy compound**

Safrole

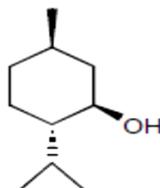


3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole

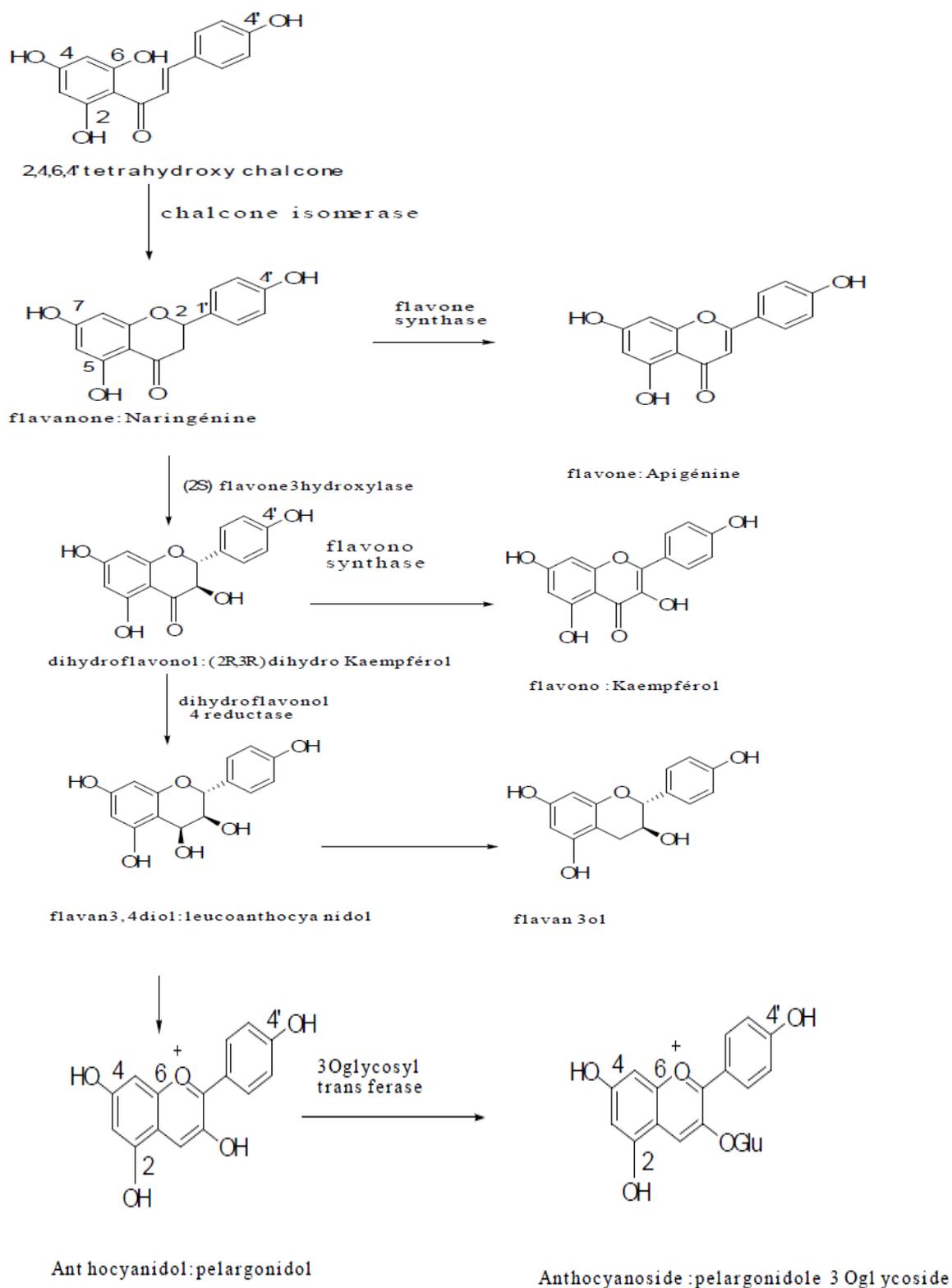


Menthol



Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

Annexe N°2



Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton 1999)

Annexe N°3

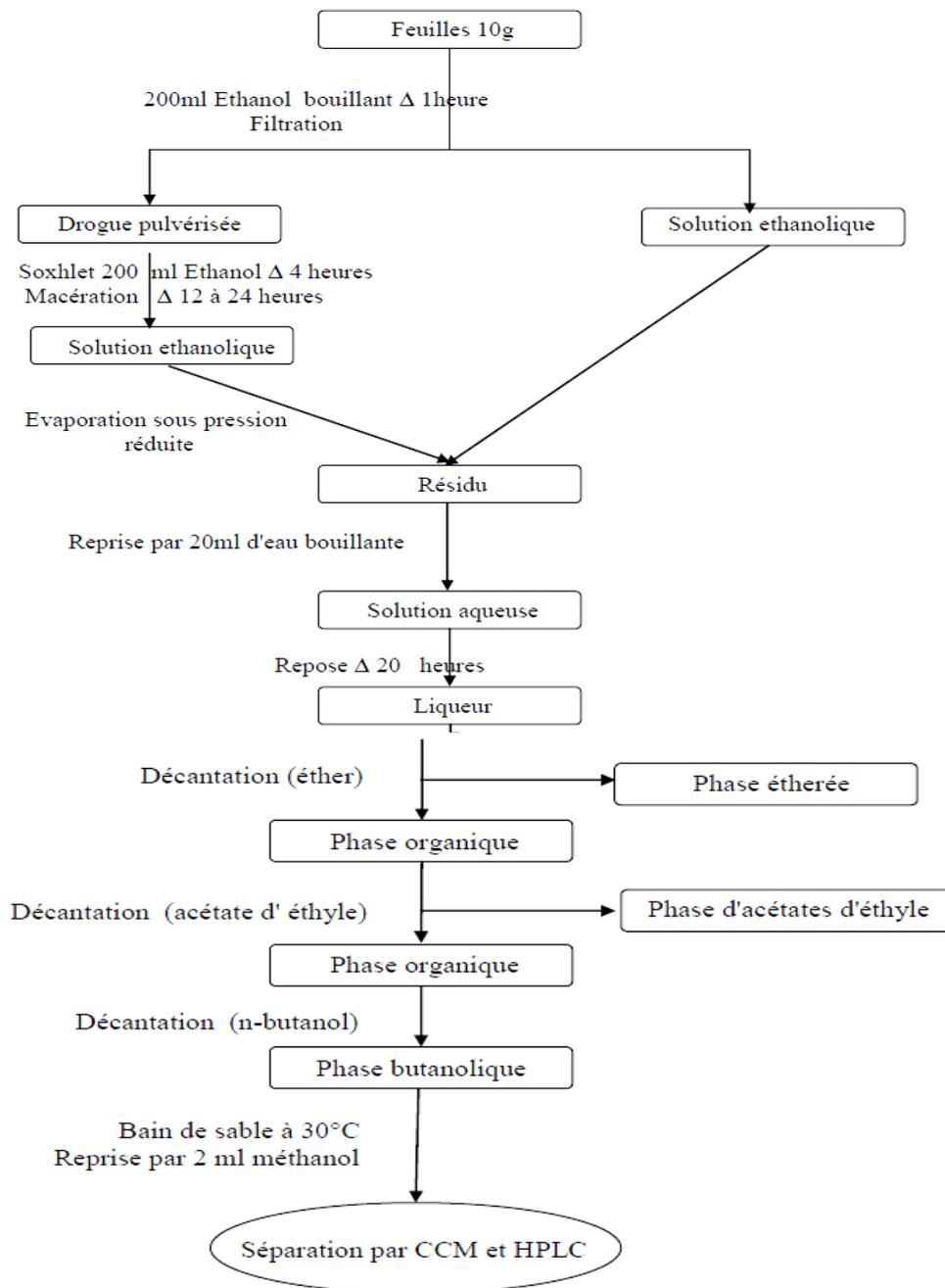


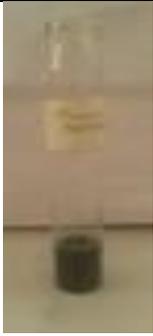
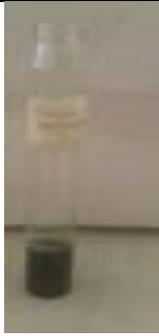
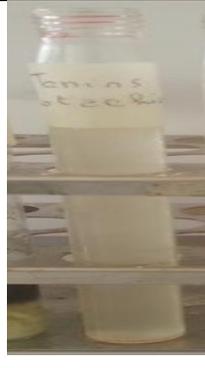
Schéma simplifié de protocole d'extraction des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes (**Bruneton 1999**)

Annexe N°4

Milieux de culture	Appareillage et petite matériel	Verreries	solvant	Réactifs
Gélose nutritive	_ Balance _ pincés stériles _ Spatule _ Chauffe ballon	_ Bécher stérile _ Boite de pétri stérile _ Tube en verre stérile	_ Eau distillée _ Ether di éthylique _ Acétone	_ Vert de méthyle _ Rouge de congo _ Méthanol
Muller Hinton	_ La loupe _ Bain marie _ Autoclaves _ Etuve _ Spectrophotomètre _ La haute _ Microonde _ Infra rouge _ Microscope électronique _ Anse de platine _ Pipette Pasteur _ Boite de pétri	_ Flacons _ Ampoule à décanter _ Ballon à fond rond _ Bec benzine _ Pipettes graduées _ Micropipette à volume fixe _ Tubes à essai _ Lame de rasoir neuve _ tamis _ Lame et lamelle _ Entonnoir	-Méthanol -Ethanol -	_ Acide ascorbique _ Acide gallique _ Carbonate de sodium _ Chlorure d'aluminium _ Sulfat d'mmoium _ Alcool butyliue _ Sulfat de sodium anhydre _ Nitrat de sodium _ Toluéne _ Chloroforme _ Formol a 40% _ Acide chlorohdrique _ Ether de pétrol _ Acide formique _ Acétat de sodium _ Brure de potasium KBR _ DPPH _

Matériel non biologique

Annexe N°5

Substances	Résultats positifs	Infusé parti aérienne fraîche		Décocté parti aérienne fraîche	
		Région 1	Région 2	Région 1	Région 2
Tanins totaux	Coloration bleu noire	 +++	 +++	 +++	 +++
Tanins galliques	Coloration bleu foncée	 +++	 +++	 +++	 +++
Tanins catéchiques	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -
Anthocyanes	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -

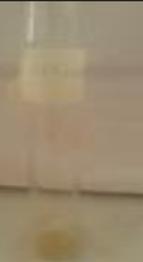
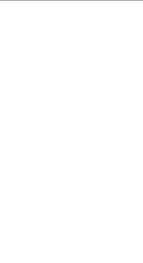
Saponosides	Précipitation blanc				
		+	+	+	+
Flavonoides	Coloration rouge orangée				
		-	-	-	-
Mucillages	Précipitation floconneuse				
		++	+	++	++
Irridoïdes	Coloration bleu				
		-	-	-	-
Sucre reducteur	Coloration rouge brique				
		-	-	-	-

Caroténoïdes	Coloration vert bleu	 -	 -		
---------------------	-------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Résultats de test phytochimique de partie aérienne fraîche 5%

Annexe N° 6

Substances	Résultats positifs	Infusé racine		Décocté racine	
		Région 1	Région 2	Région 1	Région 2
Tanins totaux	Coloration bleu noire	 +	 +	 +	 +
Tanins galliques	Coloration bleu foncée	 +	 +	 -	 +
Tanins catéchiques	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -
Anthocyanes	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -

Saponosides	Précipitation blanc	 +	 -	 +	 -
Flavonoides	Coloration rouge orangée	 -	 -	 -	 -
Mucillages	Précipitation flaconneuse	 +	 +	 +	 +
Irridoides	Coloration bleu	 -	 -	 -	 -
Sucre reducteur	Coloration rouge brique	 -	 -	 -	 -
caroténoïdes	Coloration vert bleu	 -	 -	 -	 -

Résultats de test phytochimique de racine 5%

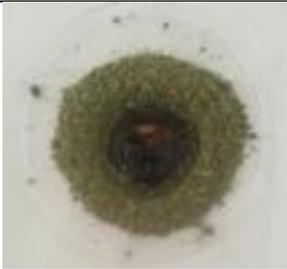
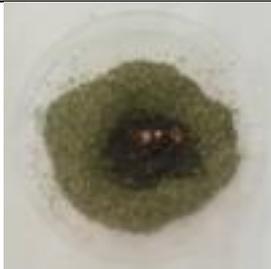
Annexe N°7

Substances	Résultats positifs	Infusé parti aérienne sèche		Décocté parti aérienne sèche	
		Région 1	Région 2	Région 1	Région 2
Tanins totaux	Coloration bleu noire	 +	 +	 +	 +
Tanins galliques	Coloration bleu foncée	 +	 +	 +	 +
Tanins catéchiniques	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -
Anthocyanes	Coloration rouge	 -	 -	 -	 -

Saponosides	Précipitation blanc	 +	 +	 +	 +
Flavonoïdes	Coloration rouge orangée	 +	 +	 +	 +
Mucillages	Précipitation floconneuse	 ++	 +	 +	 ++
Irridoïdes	Coloration bleu	 -	 -	 -	 -
Sucre réducteur	Coloration rouge brique	 +		 +	
Carotinoïdes	Coloration vert bleu	 -	 -		

Résultats de test phytochimique de la partie aérienne à 5% (sèche réduit en poudre)

Annexe N°8

Substances	Résultats positifs	Région 1	Région 2
Amidon	Coloration bleu violette	 -	 -
Glucosides	Coloration rouge brique	 +	 +
coumarines	Formation d'un trouble	 -	 -
Quinones libres	Coloration rouge	 -	 -
Alcaoides	Précipitation rouge	 -	 -

Résultats de test phytochimique de la poudre

Annexe N°9

Dilution	Diamètres d'inhibition en mm						
	Hammedi			Témoin	Benyounes		
	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8	
Souches							
<i>E.coli 84</i>	7	7	6	6	7	6	6
	7	6	6	6	7	6	6
	6	6	6	6	7	6	6
Moyenne	6,66	6,33	6	6	7	6	6
Ecart type	0,57	0,57	0	0	0	0,57	0
<i>E.coli 25922</i>	8	7	6	6	8	7	6
	7	6	6	6	8	6	6
	7	7	6	6	6	6	6
Moyenne	7,33	6,66	6	6	7,33	6,33	6
Ecart type	0,57	0,57	0	0	0,57	0,57	0
<i>Staphylococcus aureus 25923</i>	8	7	6	6	12	9	6
	8	6	6	6	12	7	6
	7	6	6	6	13	6	6
Moyenne	7,67	6,33	6	6	11,33	7,67	6
Ecart type	0,57	0,58	0	0	1,15	1,53	0
<i>Staphylococcus aureus 43300</i>	8	7	6	6	8	8	9
	6	6	6	6	10	9	6
	7	6	6	6	12	6	6
Moyenne	7	6,67	6	6	10	7,67	7
Ecart type	1	0,58	0	0	2,65	1,53	1,73
<i>E.faecalis 28</i>	10	8	8	6	9	8	8
	9	9	7	6	13	8	8
	14	12	6	6	9	6	7
Moyenne	11	9,66	7	6	10,33	7,33	7,66
Ecart type	2,65	2,08	1	0	2,65	1,53	0

Résultats des diamètres des zone d'inhibition d'extrait hydroalcolique 5%

Annexe N°10

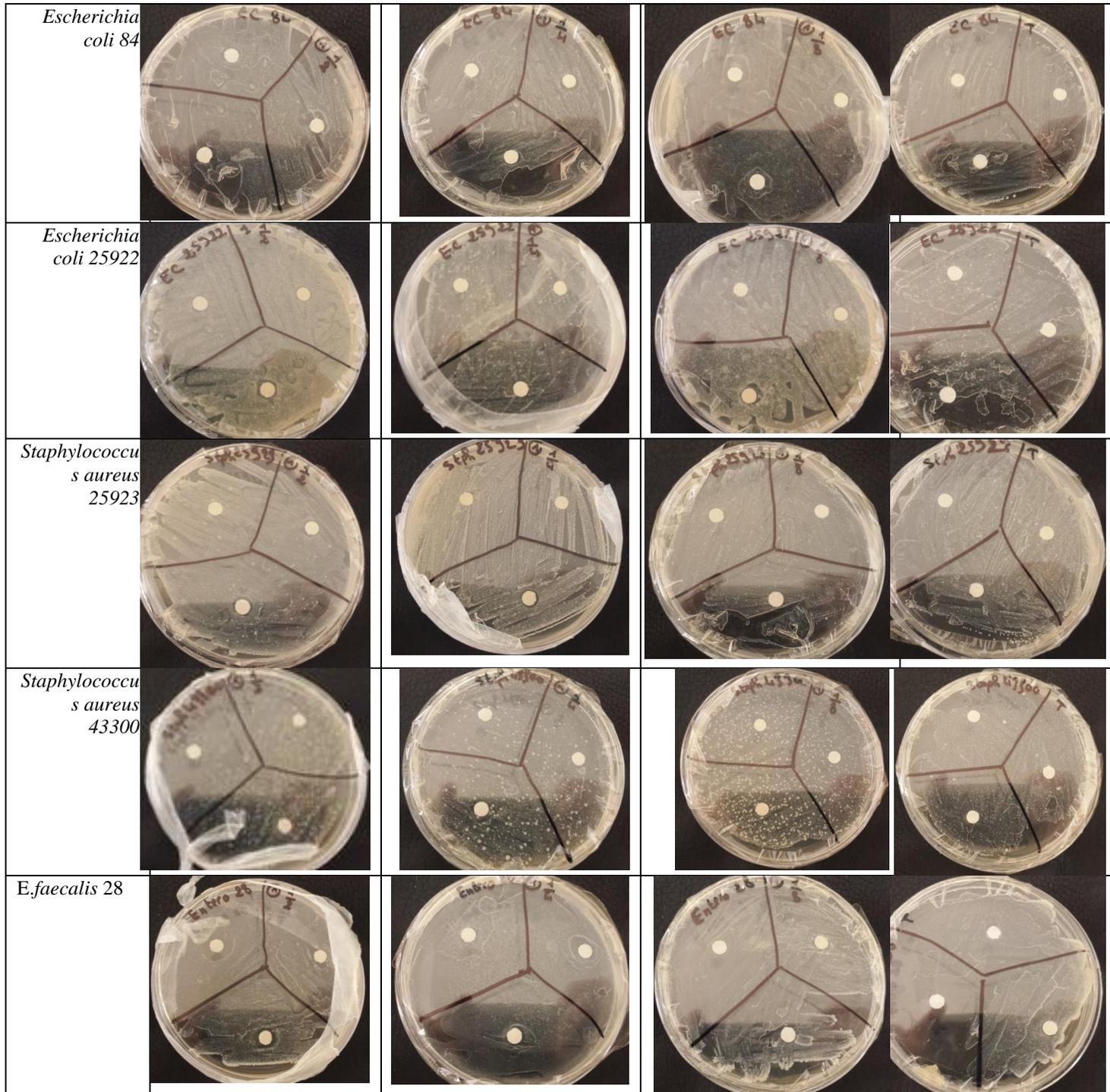
Diamètres d'inhibition en mm

Dilution	Hammedi				Témoïn		Benyounes			
	SM (1g/ml)	½	¼	1/8			SM (1 g/ml)	½	¼	1/8
<i>Souches</i>										
<i>E.coli 84</i>	15	14	10	10	6		14	12	10	9
	17	13	12	11	6		17	13	11	10
	12	14	14	11	6		17	13	10	9
Moyenne	14,66	13,66	12	10,66	6	16		12,66	10,33	9,33
Ecart type	2,51	0,57	2	0,57	0		1,73	0,57	0,57	0,5
<i>E.coli 25922</i>	16	12	12	10	6		15	13	10	9
	12	15	12	11	6		14	13	11	8
	14	12	11	10	6		14	12	10	10
Moyenne	14	13	11,66	10,33	6	14,33		12,66	10,33	9
Ecart type	2	1,73	0,57	0,57	0		0,57	0,57	0,57	1
<i>S. aureus 25923</i>	25	18	20	14	6		20	18	14	14
	24	24	18	15	6		23	15	13	15
	20	25	17	14	6		20	20	18	14
Moyenne	23	22,33	18,33	14,33	6		21	17,67	15	14,33
Ecart type	2,65	3,79	1,53	0,58	0		1,73	2,52	2,65	0,58
<i>Saureus 43300</i>	15	15	14	8	6		18	16	16	8
	16	13	13	9	6		21	17	15	9
	17	12	11	10	6		18	16	15	10
Moyenne	16	13,33	12,67	9	6		19	16,33	15,33	9
Ecart type	1	1,53	1,53	1	0		1,73	0,58	0,58	1
<i>E.faecalis 28</i>	15	14	15	14	6		20	18	16	13
	15	14	18	14	6		18	15	13	11
	18	17	16	10	6		18	19	14	12
Moyenne	16	15	16,33	12,67	6		18,67	17,33	14,33	12
Ecart type	1,73	1,73	1,53	2,31	0		1,15	2,08	1,53	1

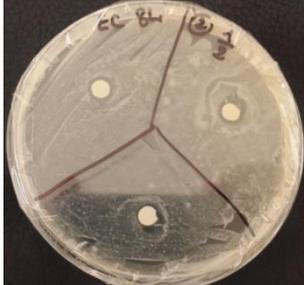
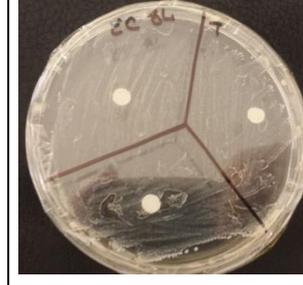
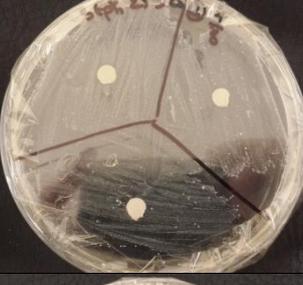
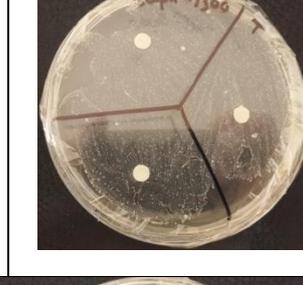
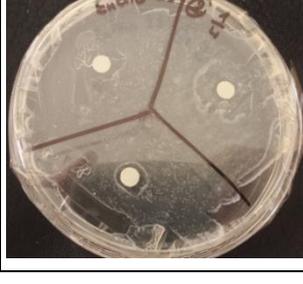
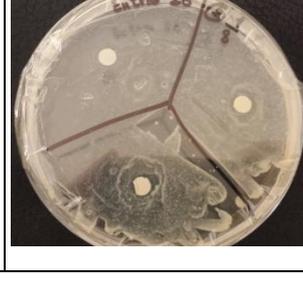
Résultats des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait brut à 25%

Annexe N°11

Région de Hammedi



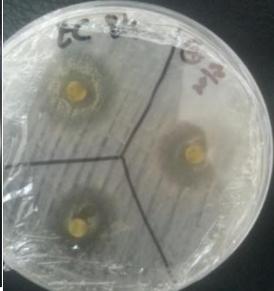
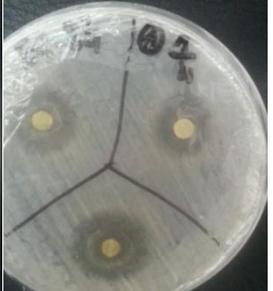
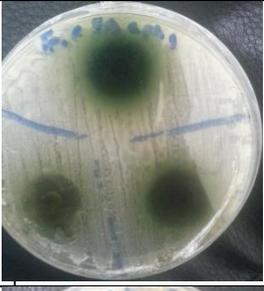
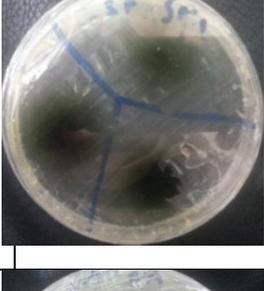
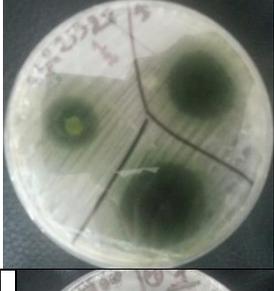
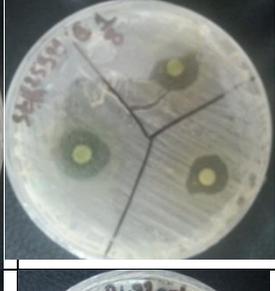
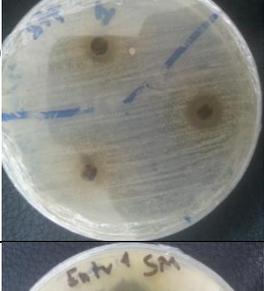
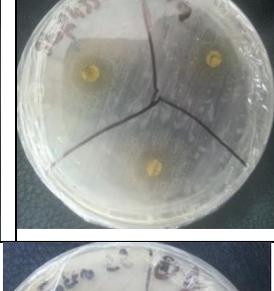
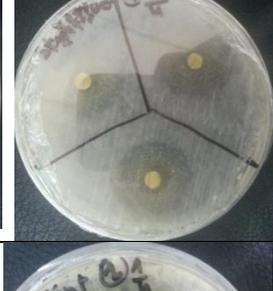
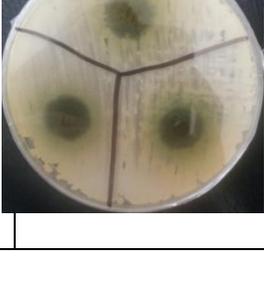
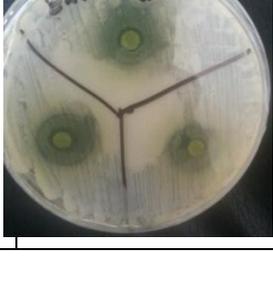
Région de Benyounes

	1/2	1/4	1/8	Témoins
<i>Escherichia coli</i> 84				
<i>Escherichia coli</i> 25922				
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923				
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300				
<i>E. faecalis</i> 28				

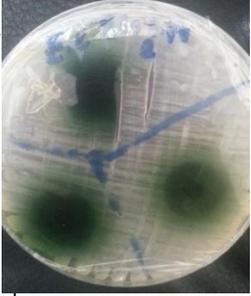
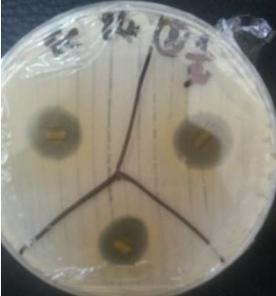
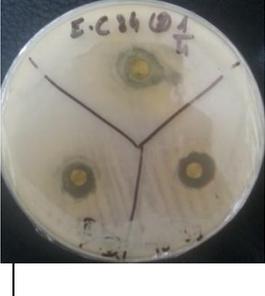
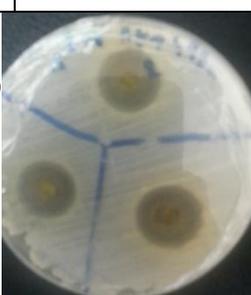
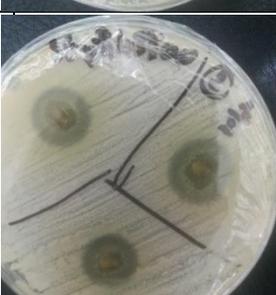
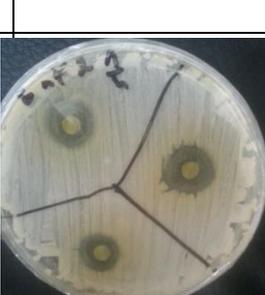
Résultat d'aromatogramme d'extrait hydro-alcoolique (macérat à 5% de la partie aérienne fraîche)

Annexe N°12

Région de Hammadi

	Solution mère	1/2	1/4	1/8
<i>Escherichia coli</i> 84				
<i>Escherichia coli</i> 25922				
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923				
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300				
<i>E. faecalis</i> 28				

Région de Benyoues

	Solution mère	1/2	1/4	1/8
<i>Escherichia coli</i> 84				
<i>Escherichia coli</i> 25922				
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923				
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300				
<i>Entérocoques</i> 28				

Résultat d'aromatogramme d'extrait brut à 25%

Résumé

Ce travail porte sur la caractérisation des molécules bioactives d'origine naturelle chez *Inula viscosa* récolté en mois de février des deux stations de la wilaya de Boumerdes. Cette plante montre une humidité relative de l'ordre de 79% et 69% respectivement pour la région de Hammedi et Benyounes. En outre, le taux de la matière sèche est de l'ordre de 21 % et 31% respectivement. Ainsi que, Le rendement d'extraction obtenu par macération hydro méthanolique est de l'ordre 3,22 % et 4,39 % respectivement dans Hammedi et Benyounes. L'étude anatomique des différentes parties de la plante révèle la présence des produits de sécrétion libres au niveau des poils sécréteurs.

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence la richesse d'*I. viscosa* en métabolites secondaires suivants: les tanins totaux, les tanins galliques, les saponosides, les mucilages les flavonoïdes et les glucosides avec absence de l'amidon, de coumarines, des quinones libres des alcaïdes, des carotinoïdes, des irridoides, des anthocyanes et des tanins catéchiques. HE extraite de la partie aérienne en poudre par hydrodistillation a révélé un rendement de l'ordre 0,16 % et 0,15% respectivement dans Hammedi et Benyounes avec des propriétés organoleptiques caractérisées par une couleur jaune pâle à transparente, une forte odeur et un aspect liquide. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes varie selon le type d'extrait et le solvant d'extraction dont l'extrait brute révèle une forte teneur de l'ordre 1347.92 mg EAG/g et 16.5mg EQ/g respectivement. L'analyse spectroscopique par infrarouge (IR) nous a permis de proposer une structure de conjugaison étendue, peut être une forme proche de hydroxyle et carboxyle relative aux flavonoïdes et aux polyphénols.

L'activité antioxydant de ces extraits a été évaluée *in vitro* par les tests du DPPH. Les résultats obtenus, il ressort que ces extraits ont une bonne capacité de piéger le radical DPPH avec des IC₅₀ de 2,61mg/ml et 2,98 mg/ml pour l'extrait de la Hammedi et l'extrait Benyounes respectivement. L'extrait hydro alcoolique (macération 5%) d'*Inula viscosa* a montré un effet bactériostatique par la méthode des disques, contre les souches à Gram (+). Tandis que l'extrait brute hydro-méthanolique (macération 25%) possède un effet bactériostatique important sur les cinq souches bactériennes pathogènes : Gram (+) et Gram (-). *Escherichia coli* 84, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 et *Entérocoques faecalis* 28.

Mots clés: *Inula viscosa* ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; spectroscopie infra rouge, Extrait hydro alcoolique ; Activité antibactérienne; infection urinaire, DPPH ;HE, test phytochimique.

Abstract

This work deals with the characterization of the bioactive molecules of natural origin in *Inula viscosa* harvested in February of the two stations of the wilaya of Boumerdes. This plant has a relative humidity of 79% and 69% respectively for the region of Hammedi and Benyounes. In addition, the dry matter content is about 21% and 31% respectively. The extraction yield obtained by hydro methanolic maceration is in the order of 3.22% and 4.39% in Hammedi and Benyounes respectively.. The anatomical study of the various parts of the plant reveals the presence of free secretion products or at the level of the secretory hairs.

Phytochemical tests have enabled us to prove the richness of *I. viscosa* into the following secondary metabolites: total tannins, gallic tannins, saponosides, mucilages, flavonoids and glucosides with no starch, coumarins, free quinones of alkanides, carotinoids, irridoids, anthocyanins and Catechic tannins. HE extracted from the powdered aerial part by hydrodistillation revealed a yield of the order of 0.16% and 0.15% respectively in Hammedi and Benyounes with organoleptic properties characterized by a pale yellow to transparent color, strong odor and Liquid appearance. The content of polyphenols and flavonoids varies depending on the type of extract and the extraction solvent from which the crude extract reveals a high content of the order 1347.92 mg EAG/g and 16.5mg EQ/g respectively. Infrared spectroscopic (IR) analysis has allowed us to propose an extended conjugation structure, can be a hydroxyl and carboxyl-like form relative to flavonoids and polyphenols.

The antioxidant activity of these extracts was evaluated *in vitro* by DPPH tests. The results obtained show that these extracts have a good capacity to trap the DPPH radical with IC₅₀s of 2.61 mg / ml and 2.98 mg / ml for the Hammedi extract and the Benyounes extract, respectively. The hydroalcoholic extract (5% maceration) of *Inula viscosa* showed a bacteriostatic effect by the disc method against Gram (+) strains. While the hydro-methanolic crude extract (25% maceration) has a significant bacteriostatic effect on the five pathogenic bacterial strains: Gram (+) and Gram (-). *Escherichia coli* 84, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 and *Enterococci faecalis* 28.

ملخص

يتناول هذا العمل توصيف جزئيات النشطة بيولوجيا من أصل طبيعي في الراسن *viscosa* التي قطف في شهر فبراير من محطتي ولاية بومرداس. تظهر هذه النبتة نسبة رطوبة بمعدل 79% و 69% على التوالي بالنسبة لمنطقة حمادي و بن يونس. بالإضافة إلى ذلك، فإن معدل المادة الجافة 21% و 31% على التوالي. كما فإن مردود الاستخراج المتحصل عليه عن طريق النقع المائي الميثانولي 3.22% و 4.39% على التوالي في حمادي وبن يونس، وتكشف الدراسة التشريحية لمختلف أجزاء النبتة وجود مواد مفروزة حرة على مستوى الشعيرات المفروزة.

وقد سمحت الاختبارات الكيميائية النباتية من كشف العديد من فوائدها الراسن *viscosa* في المستقلب الثانوية التالية: العفص الكلي والعفص الغالي، الصابونين، الصمغ، الفلافونويد، جليكوسيدات، مع غياب النشاء، الكومارين، كينونات الحرة للفلويدات، الكاروتينويد، الإبرودييد، الأنثوسيانين، والعفص catéchiques.

HE المستخرجة على شكل مسحوق من الجزء الجوي عن طريق التقطير المائي كشفت عن مردودية بلغت 0.16% و 0.15% في حمادي، و بن يونس على التوالي، مع خصائص حسية تتميز بلون أصفر شاحب إلى شفاف، رائحة قوية و مظهر سائل. محتوى البوليفينول والفلافونويد تختلف تبعاً لنوع من العينة ومذيب العينة، أين تظهر العينة الخام على نسبة عالية من التوازن، 1347.92 EAG/g و 16.5EAG/g mg على التوالي. التحليل الطيفي بواسطة الأشعة تحت الحمراء (IR) يسمح لنا باقتراح هيكلية واسعة للتصريف، يمكن أن تكون على شكل مقارب للهيدروكسيل والكريوكسيل مرتبطة بمركبات الفلافونويد والبوليفينول. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة في هذه العينات في المختبر عن طريق اختبارات DPPH. من النتائج المتحصل عليها، يتبين أن هذه العينات لديها قدرة كبيرة على مغالطة الجذر DPPH مع IC₅₀ من 2.61 ملغ / مل و 2.98 ملغ / مل من عينات حمادي و بن يونس على التوالي. وقد أظهرت العينة المائية الكحولية (النقع 5%) للراسن *viscosa* عن تأثير جراثيم Bactériostatique و هذا بطريقة الأقراس، ضد طبقات Gram (+). في حين أن الخام المائي الميثانولي المستخلص (النقع 25%) يحتوي على تأثير جراثيم Bactériostatique مهم على الخمسة طبقات بكتيرية المسببة للأمراض Gram (+) و Gram (-).
Escherichia coli 84, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 et

كلمات البحث: الراسن *viscosa*. البوليفينول. مركبات الفلافونويد. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء. المستخلص المائي الكحولي. النشاط المضاد للبكتيريا. عدوى بولية، DPPH ;HE، الاختبار الكيميائي النباتي