

N° d'ordre : 63/2010-M/S-N

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE « HOUARI BOUMEDIENE »
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN SCIENCES DE LA NATURE

**Spécialité : Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire (Diversité
des Espèces Végétales)**

Par: M^{elle} **MERAH Soumia**

Sujet

**ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES
DE *Inula viscosa* L.
RECHERCHE DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES**

Soutenu publiquement le: 12/07/2010, devant le jury composé de:

Mme N. BOUGUEDOURA	Professeur, USTHBPrésidente
Mme S. OUAFI	Maître de Conférences, USTHB.....Directrice
Mme F. AID	Professeur, USTHBExaminatrice
Mr N. HANIFI	Maître de Conférences, USTHB..... Examineur

Je dédie ce mémoire

A

Ceux que Dieu le Tout Puissant nous oblige à respecter et à chérir : mes parents, source de tendresse, d'amour et de bonheur et à qui j'exprime ma gratitude pour leur soutien, leurs sacrifices, conseils et prières qui m'ont permis d'arriver à terme de ce travail « Que Dieu vous garde ».

Manie (ma grand-mère), que Dieu t'accueille dans Son paradis.

Mon frère : Islem.

Mes sœurs : Asma, Oumeïma, Amina, Hala, Hadil.

Toute la famille (Manie, Samia, Oncles, Tantes, Cousins, Cousines).

Toutes mes amies : Zouina, Akila, Hassiba, Sadia, Salma,...

Tous ceux qui me sont chers.

Tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.

Tous les étudiants intéressés par ce modeste mémoire.

Avant propos

Lorsqu'un mémoire s'achève, un désir s'empare de nous afin de remercier chacune des personnes dont la contribution a permis à ce travail de voir le jour.

Tout d'abord, nous remercions Allah Tout Puissant de nous avoir donné la santé, la volonté, la patience et le courage pour mener à bien ce projet.

Les travaux rapportés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides (LRZA) à l'Université d'Alger sous la direction de Madame Saida Ouafi.

Notre profonde gratitude et sincère reconnaissance s'adressent à notre directrice de mémoire Madame S.Ouafi, Maître de conférences à l'USTHB pour nous avoir proposé ce sujet, pour sa patience, sa disponibilité, son soutien et ses conseils pertinents durant tous nos travaux.

Nous remercions Madame N. Bouguedoura Professeur à l'USTHB qui en plus de nous faire l'honneur de présider le jury de soutenance a tenu à corriger ce mémoire. Qu'elle reçoive ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions Madame F. Aïd, Professeur à l'USTHB d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail. Nous la remercions beaucoup.

Nous remercions Monsieur N. Hanifi, Maître de conférences à l'USTHB pour nous avoir honorés de sa présence en acceptant de juger ce travail. Nous l'assurons de notre dévouement.

Nos sincères remerciements s'adresseront à Madame A Belkadi Docteur vétérinaire, qui nous a autorisé à réaliser des expérimentations au sein du Centre de Recherche et de Développement à SAIDAL (CRD-SAIDAL), ainsi que pour son aide inestimable. A tous les chercheurs, ingénieurs et techniciens du laboratoire de pharmacologie et microbiologie en particulier M^{elle} M. Hadad, Sofia, Latifa.

A tout le personnel du LRZA (enseignants et techniciens) en particulier Mme Bouhired, Mme Chabane, Karima O., Sahnoun, Amar, Karima M., Mohamed, Khalti Fatiha et les étudiantes Farida, Nadia, Lydia, Fati, Chrifa, Souad, Souhila pour leur bonne compagnie.

Enfin nous tenons à remercier tous les enseignants de l'institut de Biologie qui nous ont suivi tout au long de notre cursus universitaire. En particulier Mr Abderahmani et Mme Touam à qui nous témoignons notre profond respect.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATB: Antibiotiques
Ac. Ace : Acétyle Acétone
ACP : Analyse à Composante Principale
AlCl₃ : Chlorure d'aluminium
Benz : Benzène
CAH : Classification Ascendante Hiérarchique
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
cm: centimètre
CP : Chromatographie sur Papier
CRD : Centre de Recherche et de Développement de SAIDAL
D : Diamètre
DO : Densité optique
g : gramme
H₂O : Eau
HCL : Acide Chlorhydrique
IA : Indice Antifongique
IU : Indice d'Ulcération
LRZA : Laboratoire de la Recherche sur les Zones Arides
Me Et Ce : Méthyle Ethyle Cétone
Me OH : Méthanol
MH : Muller Hinton
ml : millilitre
mm : millimètre
mn : minute
nm : nanomètre
PBZ : Phénylbutazone
PDA : Potatoes Dextrose Agar
PH: Potentiel hydrique
PR : Pourcentage de Réduction
Rf : Rapport frontal
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
SAB : Sabouraud
UV : Ultra violet
VIP : Voie intra péritonéale
% : Pourcentage
µl : microlitre
µm : micromètre

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Appareil végétatif de *Inula viscosa* (L.) (Station de Thénia, 2008).
- Figure 2.** Feuilles de *Inula viscosa*(L.).
- Figure 3.** Poil glandulaire pédonculé de *Inula viscosa* (L.).
- Figure 4.** Inflorescences de *Inula viscosa*(L.).
- Figure 5.** Formule générale d'une Coumarine.
- Figure 6.** Squelette de base des flavonoïdes.
- Figure 7.** Squelette de base des anthocyanes.
- Figure 8.** Réseaux métaboliques responsables de la synthèse des flavonoïdes chez les plantes.
- Figure 9.** Carte géographique représentant la zone de récolte (carte Michelin).
- Figure 10.** Protocole expérimental d'extraction, de dosage et d'identification des flavones flavonols , acides phénols , anthocyanes et C-glycosides de *Inula viscosa* (L.), selon Lebreton (1967) modifié par Ouafi (2007).
- Figure 11.** Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres de *Inula viscosa* (L.) selon Ouafi (2007).
- Figure 12.** Protocole expérimental d'extraction, de dosage et d'identification des hétérosides flavoniques de *Inula viscosa* (L.), par macération hydro- éthanolique selon Harborne (1973).
- Figure 13.** Schéma représentatif du principe de fonctionnement de C.L.H.P.
- Figure 14.** Schéma représentant la transmission de la lumière à travers une solution.
- Figure 15.** Réaction de chélation en position 3 et 5 des polyphénols avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).
- Figure 16.** Courbe d'étalonnage des hétérosides flavoniques obtenue à partir d'une solution mère de rutine à 8‰.
- Figure 17.** Les étapes du modèle excisionnel (protocoles expérimentaux internes du C.R.D)
- Figure 18.** Protocole expérimental de décoction.
- Figure 19a et 19b.** Photos des plaques chromatographiques des aglycones flavoniques obtenus par C.C.M monodimensionnelle sur gel de polyamide.
- Aglycones flavoniques obtenus avant hydrolyse acide (Aglycones libres).
 - Aglycones flavoniques obtenus après hydrolyse acide en présence de produits de références.
- Figure 20.** Schéma du chromatogramme monodimensionnel des aglycones flavoniques obtenus sans hydrolyse acide et après hydrolyse acide.
- Figure 21.** Photo de la plaque chromatographique des C-glycosides obtenus par C.C.M bidimensionnelle sur gel de polyamide.
- Figure 22.** Schéma du chromatogramme bidimensionnel des C-glycosides flavoniques.
- Figure 23.** Photo de la plaque chromatographique des hétérosides flavoniques obtenus par C.C.M bidimensionnelle sur gel de polyamide.
- Figure 24.** Schéma du chromatogramme bidimensionnel des hétérosides flavoniques.
- Figure 25.** Profil chromatographique représentant les flavones-flavonols, détectés par C.L.H.P à 365 nm en mode gradient d'élution.
- Figure 26.** Profil chromatographique représentant les acides phénols détectés par C.L.H.P à 260 nm en mode gradient d'élution.

- Figure 27.** Profil chromatographique représentant les aglycones libres détectés par C.L.H.P à 365 nm en mode gradient d'élution.
- Figure 28.** Profil chromatographique représentant les C-glycosides détectés par C.L.H.P à 370 nm en mode gradient d'élution.
- Figure 29.** Profil chromatographique des hétérosides flavoniques détectés par C.L.H.P à 370 nm en mode gradient d'élution.
- Figure 30.** Spectre d'absorption des anthocyanes de *Inula viscosa* (L.) détecté par spectrophotométrie UV-visible.
- Figure 31.** Projection des variables étudiées sur les axes de l'ACP normée centrée.
- Figure 32.** Projection des 35 individus sur les axes de l'ACP.
- Figure 33.** Dendrogramme issu de la CAH portant sur les quatre variables étudiées.
- Figure 34.** Projection des individus en fonction des variables étudiées deux à deux.
- Figure 35.** Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur les 35 individus étudiés.
- Figure 36.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur les bactéries Gram+.
- Figure 37.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur les bactéries Gram-.
- Figure 38.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur *Candida albicans* (C.a).
- Figure 39.** Résultat du criblage du pouvoir antimicrobien des extraits réalisé par la méthode des disques.
- Figure 40.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.
- Figure 41.** Résultat du pouvoir antifongique des extraits de *Inula viscosa* (L.) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.
- Figure 42.** Histogramme des pourcentages de réduction des surfaces des plaies traitées par le Banéocin et la poudre végétale de *Inula viscosa* (L).
- Figure 43.** Evaluation histologique des plaies traitées par *Inula viscosa* (L.) (a+b) et par le Banéocin (c+d) à J14 (cicatrisation proprement dite).
- Figure 44.** Evolution pondérale des six lots de rats traités à la phénylbutazone.
- Figure 45.** Vue macroscopique d'un estomac ulcéré.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Usages et intérêts thérapeutiques.
- Tableau 2.** Les groupes d'acides phénols dérivants de l'acide hydroxybenzoïque.
- Tableau 3.** Les groupes d'acides phénols dérivants de l'acide hydroxycinnamique.
- Tableau 4.** Principaux anthocyanidols entrants dans la structure des anthocyanes.
- Tableau 5.** Les conditions de C.L.H.P.
- Tableau 6.** Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des flavones-flavonols, aglycones libres et acides phénols.
- Tableau 7.** Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des C- glycosides et des hétérosides.
- Tableau 8.** Densités optiques en fonction des différentes concentrations de la rutine
- Tableau 9.** Cotation des ulcères.
- Tableau 10.** Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait étheré (avant et après hydrolyse acide) de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.C.M monodimensionnelle.
- Tableau 11.** Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait butanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par CCM bidimensionnelle sur gel de polyamide.
- Tableau 12.** Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait hydro alcoolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par CCM bidimensionnelle sur gel de polyamide.
- Tableau 13.** Caractéristiques chromatographiques des flavones-flavonols contenus dans l'extrait étheré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 365 nm.
- Tableau 14.** Caractéristiques chromatographiques des acides phénols de l'extrait étheré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 260 nm.
- Tableau 15.** Caractéristiques chromatographiques des aglycones libres de l'extrait étheré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 260 nm.
- Tableau 16.** Caractéristiques chromatographiques des C-glycosides de l'extrait butanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 370 nm.
- Tableau 17.** Caractéristiques chromatographiques des hétérosides contenus dans l'extrait hydro éthanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 370 nm.
- Tableau 18.** Teneurs absolues (mg/g) en composés phénoliques chez les 35 individus de *Inula viscosa* (L.) étudiés.
- Tableau 19.** Tableau de corrélation entre les variables étudiées.
- Tableau 20.** Les diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.).
- Tableau 21.** Diamètres de croissance et indices antifongiques de *Fusarium oxysporum* f .sp *albedinis* sous l'action des différents extraits de *Inula viscosa* (L.)
- Tableau 22.** Moyennes des surfaces des plaies (cm²) calculées pour chaque lot à trois jours d'intervalle.
- Tableau 23.** Pourcentages de réduction des plaies (%) calculés pour chaque lot à trois jours d'intervalle.
- Tableau 24.** Effet de l'extrait flavonique et des décoctés de *Inula viscosa* (L.) sur l'ulcère induit par la phénylbutazone chez les rats.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. <i>Inula viscosa</i> (L.)	3
1.1. Dénomination	3
1.1.1. Nom scientifique et synonymes	3
1.1.2. Noms vernaculaires.....	3
1.2. Position systématique.....	3
1.3. Description morphologique	4
1.4. Multiplication	5
1.5. Localisation géographique.....	5
1.6. Phytochimie de <i>Inula viscosa</i> (L.)	6
1.7. Intérêts de la plante.....	6
1.7.1. Intérêts biologiques.....	6
1.7.2 Intérêts pharmacologiques et thérapeutiques.....	6
1.8. Divers travaux antérieurs sur <i>Inula viscosa</i> (L.)	7
2. Les composés phénoliques	8
2.1. Définition	8
2.2. Classification des composés phénoliques	9
2.2.1. Formes les plus simples.....	9
2.2.1.1. Les acides phénoliques.....	9
2.2.1.2. Les flavonoïdes.....	10
2.2.2. Formes condensées (les tanins)	15
2.3. Métabolisme des flavonoides.....	15
2.4. Propriétés biochimiques.....	17
2.4.1. Les aglycones flavoniques.....	17
2.4.2. Les hétérosides flavoniques.....	17
2.5. Rôles et intérêts des polyphénols.....	18
2.5.1.Intérêts thérapeutiques.....	18
2.5.2. Rôle et intérêt biologique dans le règne végétal.....	19

2.5.3. Rôle et intérêt biologique pour l'homme.....	20
2. 6. Mode d'action des polyphénols vis-à-vis des microorganismes.....	20
3. Généralités sur les microorganismes à tester.....	21
3.1. Les bactéries.....	21
3.1.1. Bactéries gram +	21
3.1.2. Bactéries gram -	21
3.2. Les levures.....	22
3.3. Les champignons.....	22

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	23
1.1. Matériel biologique.....	23
1.1.1. Matériel végétal	23
1.1.2. Matériel microbiologique	24
1.1.3. Les Animaux	24
1.2. Matériel non biologique.....	24
2. Méthodes	25
2.1. Méthodes d'extractions des composés phénoliques.....	25
2.1.1. Extraction hydrolytique.....	25
2.1.2. Extraction des aglycones libres (Ouafi, 2007).....	27
2.1.3. Extraction des hétérosides flavoniques, Macération hydro-éthanolique.....	28
2.2. Techniques d'analyse	29
2.2.1. Analyse qualitative	29
2.2.1.1. Chromatographie sur couche mince (C.C.M) et sur papier (CP).....	29
2.2.1.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P).....	31
2.2.2. Analyse quantitative par Spectrophotométrie.....	34
2.2.2.1. Dosage spectrophotométrique de composés phénolique.....	36
2.2.2.2. Analyse statistique des données.....	38
2.3. Tests microbiologiques.....	39
2.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique	39
2.3.1.1. Principe.....	39
2.3.1.2. Protocole expérimental	39
2.3.2. Evaluation de l'activité antifongique (champignon).....	41

2.4. Etude pharmacologique.....	41
2.4.1. Evaluation de l'effet cicatrisant de la poudre végétale de <i>Inula viscosa</i> (L.) par le modèle excisionnel chez la souris.....	41
2.4.1.1. Objectif	41
2.4.1.2. Principe.....	41
2.4.1.3. Protocole expérimental.....	42
2.4.2. Activité antiulcère gastroduodéal de <i>Inula viscosa</i> (L.).....	44
2.4.2.1.Principe et objectif	44
2.4.2.2.Produits administrés.....	44
2.4.2.3. Protocole expérimental	45

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Etude biochimique des composés phénoliques de <i>Inula viscosa</i> (L.)	48
1.1. Analyse qualitative des composés phénoliques par C.C.M et C.P	48
1.1.1. Identification des aglycones flavoniques par chromatographie sur couche mince (C.C.M) monodimensionnelle	48
1.1.2. Identification des C-glycosides par C.C.M bidimensionnelle	51
1.1.3. Identification des hétérosides (C-glycosides et O-glycosides) par C.C.M bidimensionnelle	53
1.1.4. Identification des anthocyanes par chromatographie descendante sur papier Whatman (CP).....	56
1.2. Analyse qualitative des composés phénoliques par C.L.H.P	56
1.2.1. Identification des flavones-flavonols et des acides phénols par la C.L.H.P.....	56
1.2.2. Identification des aglycones libres par la C.L.H.P.....	60
1.2.3. Identification des C-glycosides par la C.L.H.P.....	60
1.2.4. Identification des hétérosides flavoniques par la C.L.H.P	62
1.3. Analyse quantitative des composés phénoliques par spectrophotométrie	64
1.3.1. Analyse de la diversité de l'espèce <i>Inula viscosa</i> (L.) par rapport aux variables chimiques mesurées.....	66
1.3.1.1. Analyse factorielle.....	67
1.3.1.2. Classification hiérarchique ascendante (CAH).....	68
2. Tests antimicrobiens	70
2.1 Activité antibactérienne et antifongique (levures).....	70

2.2. Activité antifongique (moisissure phytopathogène).....	76
3. Activité cicatrisation cutanée.....	78
3.1. Etude morphologique.....	78
3.2. Etude histologique	79
4. Activité antiulcéreuse.....	80
4.1. Activité ulcéreuse de la phénylbutazone (PBZ).....	82
4.2. Evaluation de l'activité antiulcéreuse.....	83
Conclusion générale et perspectives.....	85
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 87
ANNEXES	97

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude des composés phénoliques des feuilles de *Inula viscosa* (L.) Aiton, de la famille des Asteraceae. Cette espèce a été choisie pour son intérêt thérapeutique et sa grande capacité antioxydante.

L'extraction des grandes familles de polyphénols par différents solvants (polaires et apolaires), nous a permis de :

- quantifier par spectrophotométrie UV visibles les composés suivants (flavones-flavonols: $0.71 \text{ mg/g} \pm 0.23$, C-glycosides: $0.41 \text{ mg/g} \pm 0.13$, aglycones flavoniques libres: $0.62 \text{ mg/g} \pm 0.19$ et hétérosides: $1.73 \text{ mg/g} \pm 0.54$).
- révéler et identifier par Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M), sur Papier (C.P) et par Chromatographie Liquide à Haute Performance (C.L.H.P), la composition phénolique de chaque famille à savoir: 5 flavones (Lutéoline, Chrysoeriol, Tricine, Naringénine et Apigénine), 5 flavonols (Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnocitrine, Rhamnétine et Kaempférol), 2 flavanonols (Taxifoline et Taxifoline 7 méthyl), 6 acides phénols de la série cinnamique (Acide caféique, Acide chlorogénique et ses trois isomères: Acide dicafeoyl 4-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-4 quinique et l'Acide coumarique.), 11 C-glycosides (Mono-C-Tricine, Mono-C-Lutéoline (Orientine), Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine) Mono-C-Apigénine (Vitexine), Di-C-Lutéoline, Di-C-Apigénine, Mono-C-Apigénine (Isovitexine), Mono-C-Quercétine, Mono-C-Kaempférol, Di-C-Apigénine (iso) et Di.-C-Tricine) et 9 O-glycosides (Rutine, Galactoside 3 Isorhamnétine, Galactoside 3 Quercétine, Rhamnoside 7 Chrysoeriol, Rhamnoglycoside 7 Tricine, Glucoside 7 Chrysoeriol, Glucoside 7 Tricine, Glucoside 7 Isorhamnétine et Glucoside 7 Lutéoline). Aucun anthocyane n'a été révélé.

Les résultats de la recherche de la diversité polyphénolique intraspécifique ont montré que les individus étudiés se répartissent en quatre chémotypes distincts ce qui dénoterait d'une éventuelle présence de clones dans l'espèce *Inula viscosa* (L.).

Les tests microbiologiques et pharmacologiques ont montré que: les composés phénoliques de *Inula viscosa* (L.) possèdent une activité antibactérienne et antifongique, un pouvoir cicatrisant sur les plaies d'excision chez la souris. L'effet antiulcérogénique est du à la composition flavonique.

Mots clés: *Inula viscosa* (L.); composés phénoliques; biodiversité phénolique; activité antibactérienne et antifongique; cicatrisation cutanée; effet antiulcérogénique.

Introduction

Ces dix dernières années le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la bio-médecine occupe une grande place dans les systèmes de santé.

«La médecine traditionnelle qui est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques reposant rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture, est utilisée pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales » (Mogode, 2005).

L'emploi des plantes comme remède trouve son origine depuis la plus haute antiquité. Les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles.

Les premiers guérisseurs connaissaient déjà les plantes, dont ils ont appris les effets sur la maladie par l'expérience et une observation attentive. Elles étaient associées à des pratiques spirituelles et magiques, ce qui leur vaut un certain prestige au sein de la communauté. Cet intérêt tout particulier porté à l'art de guérir se remarque également tout au long de l'histoire et les recherches modernes ne font que redécouvrir ce savoir acquis au cours des siècles (Kassel, 2003).

Actuellement, cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt, et c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales.

La plante a une composition chimique très complexe, les centaines de substances qui la composent participent ensemble à son activité médicinale. C'est en effet la synergie de tous les constituants qui confère à la plante ses effets thérapeutiques recherchés.

Les principes actifs sont essentiellement des alcaloïdes, des terpénoïdes et des polyphénols (Paris et Hurabielle, 1980).

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances et constituent l'une des classes du métabolisme secondaire. Ce sont des pigments responsables de la coloration des feuilles, des fleurs et des fruits. Ils sont impliqués dans la chimiotaxonomie de plusieurs classes de végétaux et dans le mécanisme de résistance à plusieurs maladies, grâce à leurs propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires. Ils participeraient à la prévention de

diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

L'espèce *Inula viscosa* (L.) Aiton (*Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), est connue en Algérie sous le nom vernaculaire de Magramane ou Amagramane. Plante vivace, herbacée aromatique de la famille des Asteraceae, elle peut atteindre de 50 cm à 1 m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreux au sommet de la tige. Ses feuilles sont entières et lancéolées (Quezel et Santa, 1963). C'est une plante largement répandue dans le Nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen (Benayache et al., 1991).

Cette espèce jouit d'une grande popularité comme herbe médicinale dans le traitement des bronchites (Bellakhdar et al., 1997), des blessures et des troubles gastro-intestinaux (Lastra et al., 1993; Al-Dissi, 2001). Elle possède des propriétés antioxydantes (Manez et al., 1999; Hernandez et al., 2005), anti-inflammatoires (Barbetti et al., 1985), antimicrobiennes (Lauro et al., 1990), et antidiabétiques (Yaniv et al., 1987).

La composition de *Inula viscosa* (L.) en substances volatiles, terpenoïdes, en flavonoïdes sous forme d'aglycones est bien établie. En revanche, il n'existe que peu de travaux sur la composition de cette plante en flavonoïdes glycosylés (Wollenweber et al., 1991).

La présente étude a pour objectif l'analyse quantitative et qualitative des composés phénoliques présents dans les feuilles de *Inula viscosa* (L) sous forme d'aglycones et de glycosides ainsi que l'étude des activités biologiques des composés isolés.

Nos travaux s'organisent donc en deux parties:

* dans une première étape nous réalisons une analyse quantitative et qualitative par l'extraction et le dosage des différentes classes de composés phénoliques, sur trente cinq (35) individus de *Inula viscosa* (L) de la région de Thénia (Wilaya de Boumerdès).

Les résultats des analyses quantitatives font ensuite l'objet d'analyses statistiques menées par une ACP, CAH ainsi que par des corrélations, en vue de déceler une éventuelle biodiversité phénolique intra spécifique.

* la deuxième étape consiste à tester diverses activités biologiques à savoir:

- activité antimicrobienne via les extraits phénoliques.
- activité cicatrisante cutanée via la poudre végétale.
- activité antiulcérogénique via le décocté et l'extrait hydroéthanolique de la plante.

1. *Inula viscosa* (L.)

C'est une plante fréquente en région méditerranéenne où elle fleurit à la fin de l'été et au début de l'automne. C'est une plante toute glanduleuse visqueuse, à forte odeur (Coste, 1983).

1.1. Dénomination

1.1.1. Nom scientifique et synonymes

Nom latin : *Inula viscosa* (L.) Aiton.

Synonymes : *Cupularia viscosa* G.et G.

Dittrichia viscosa (L.) Greuter.

Erigeron viscosa (L.) (Loret et Barrandon, 1888).

1.1.2. Noms vernaculaires

Nom français: Inule visqueuse.

Nom arabe: Rassendebk, Tioune, Tebak, Mersitt.

Alger: Hfina, Safsak, Magramane.

Maghreb: Terahla, Magraman.

Kabylie: Telirine, Nirette, Amrilele, Serchil.

Nom anglais: Ele campagne, Rock flea-bane (Quezel et Santa, 1963; Halimi, 2004)

1.2. Position systématique

Nous avons adopté la classification de APG II 2003 (Spichiger et *al.*, 2002).

- Règne : Plantae.
- Embranchement : Spermatophytes.
- Sous embranchement : Angiospermes.
- Classe : Eudicotylédones
- Sous classe : Astéridées
- Ordre : Asterales.
- Famille : Asteraceae.
- Genre : *Inula*.
- Espèce : *Inula viscosa* (L.) Aiton.

1.3. Description morphologique

Le Magramane est une plante vivace qui mesure de 50 cm à 1 m de haut. Elle présente une forte racine pivotante lignifiée qui peut atteindre 30 cm de long.

Sa tige dressée, très feuillée, est frutescente à la base (**Figure 1**).

Les feuilles sont caduques, caulinaires embrassantes, légèrement collantes. Elles sont lancéolées, dentées, aiguës au sommet (**Figure 2**).



**Figure 1. Appareil végétatif de *Inula viscosa* (L.) Figure 2. Feuilles de *Inula viscosa* (L.).
(Station de Thénia, 2008).**

L'appellation «visqueuse» est due à la présence de nombreux poils à la surface de la tige et des feuilles. Ces poils sont de deux sortes: des poils tecteurs qui sont très long (2 mm) multicellulaires, unisériés et des poils sécréteurs glandulaires multicellulaires et bisériés. Ces derniers sont soit sessiles soit pédonculés présentant une partie glandulaire similaire formée par quatre (très rare) ou cinq paires de cellules sécrétrices (Werker et Fahn, 1981).

Les poils glandulaires pédonculés sont de forme cylindrique (**Figure 3**), la partie apicale est recouverte par une chambre sous cuticulaire sphérique et large (Ciccarelli et *al.*, 2007) qui contient des terpénoïdes volatiles pour favoriser la pollinisation des fleurs et pour protéger la plante et sa reproductibilité de la destruction des herbivores et des pathogènes (Kelsey et *al.*, 1984; Harborne, 1993).

Les fleurs sont rayonnantes, de couleur jaune (**Figure 4**), regroupées en inflorescences. Il s'agit de capitules assez gros formant de longues grappes pyramidales. On les observe en septembre-

octobre. Les fruits sont des akènes portant au sommet des poils jaunâtres en aigrette (De Lamarck et De Candolle, 1815; Bayer et *al.*, 1990; Bärtels, 1998).

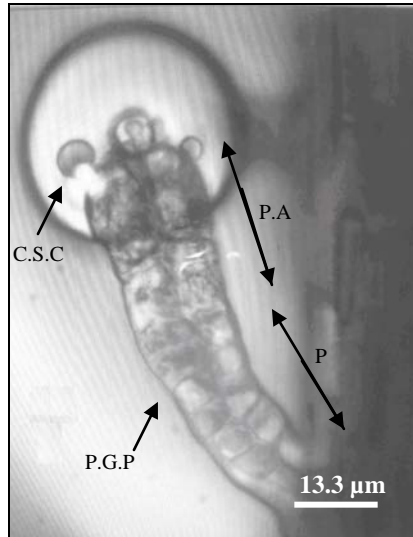


Figure 3. Poil glandulaire pédonculé de *Inula viscosa* (L.)

C.S.C: chambre sous cuticulaire,
P.G.P: poil glandulaire biserie pédonculé,
P : pédoncule,
P.A :partie apicale.
(In: Ciccarelli et *al.*, 2007).



Figure 4. Inflorescences de *Inula viscosa* (L.)

1.4. Multiplication

La multiplication de *Inula viscosa* (L.) est assurée par voie sexuée via la dissémination des graines ou par voie végétative par division (Bärtels, 1998).

1.5. Localisation géographique

Notre espèce est native du bassin méditerranéen, disponible sur le bord des routes et des champs abandonnés. Elle se développe dans les terres pierreuses de forte composition en calcaire et elle apprécie les endroits plutôt ensoleillés (ne s'élevant pas à plus de 500 m sur les montagnes). Elle est essentiellement localisée dans les zones suivantes :

Afrique du Nord: Algérie, Egypte, Libye, Maroc, Tunisie.

Asie Occidentale: Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Turquie.

Europe: Albanie, Bulgarie, Grèce, Italie, Yougoslavie.

L'Europe du Sud-Ouest: France (Corse incluse), Portugal, Espagne (îles Canaries inclus) (Boulus, 1983; Baytop, 1984; AL-Eisawi, 1998).

En Algérie, l'espèce est localisée dans les régions de moyenne altitude du Tell, dans les terres garrigues et rocailles ainsi que dans les terrains argileux secs (Quezel et Santa, 1962).

1.6. Phytochimie de *Inula viscosa* (L.)

Cette plante contient une huile essentielle dont les composés majoritaires sont des sesquiterpènes, de la résine et des tanins. Elle contient également de l'inuline, des flavonoïdes, de la paraffine et des azulènes. On rapporte aussi la présence de mucilage et de quelques sels minéraux (Bonnier, 1934; Chiappini et al., 1982; Grande et al., 1985; Benayache et al., 1991; Sanz et al., 1991; Wollenweber et al., 1991; Abu Zarga et al., 1998; Abu Zarga et al., 2003; Ay et Zouache, 2007).

1.7. Intérêts de la plante

1.7.1. Intérêts biologiques

Les travaux d'Isaakides (1957) montrent que *Inula viscosa* (L.) joue un rôle dans la lutte biologique contre la mouche d'olivier "*Bactrocera oleae*". En milieu relativement préservé, c'est-à-dire où les applications d'insecticides sont nulles, *Inula viscosa* (L.) est parasitée par le diptère *Myopites stylata* qui forme des galles sous les inflorescences. Cette mouche peut être parasitée en hiver par *Eupelmus urozonus*, qui parasitera efficacement *Bactrocera oleae* (mouche de l'olivier) de ce fait, les olives ne sont pas piquées l'été suivant (Warlop, 2006).

1.7.2 Intérêts pharmacologiques et thérapeutiques

Les effets médicinaux de *Inula viscosa* (L.) sont dus à la présence de composés chimiques actifs. Le **tableau 1** montre que toutes les parties de *Inula viscosa* (L.) ont des propriétés intéressantes (Dafni et al., 1984; Oran et AL-Eisawi, 1998; Ali-Shtayeh et al., 2000; Lentini, 2000; Halimi, 2004; Lyle et al., 1580; Bonnier, 1934; Máñez et al., 1999; Maoz et al., 1999; Hernandez et al., 2001).

Tableau 1. Usages et intérêts thérapeutiques

Partie de la plante utilisée	Usage	Intérêts thérapeutiques
Feuilles	1-Tisane préparée et consommée quotidiennement. 2-Jus pressé et consommé par gouttes. 3-Cataplasme.	-Diabète (hypoglycémie). -Diarrhée. -Vermifuge. - Sudorifique. - Antiulcéreux. -Douleurs rhumatismales. -Cicatrisation. -Analgésique contre les céphalées. - Douleurs abdominales.
Inflorescence	1-Séchée sous le soleil puis coupée et mixée avec l'huile d'olive et étendue autour de l'anus.	- Hémorroïdes.
Huiles essentielles		-Antibiotique. -Bronchites. -Tuberculose. -Paludisme.

1.8. Divers travaux antérieurs sur *Inula viscosa* (L.)

L'espèce *Inula viscosa* (L.) a fait l'objet de plusieurs projets de recherche à travers le monde qui concernaient à la fois la détermination des modes d'extraction adéquats des essences et des métabolites secondaires de la plante, leur composition puis l'évaluation des différentes activités biologiques et autres.

Les analyses quantitatives et qualitatives des huiles essentielles de *Inula viscosa* (L.) par CG/MS ont montré la présence de fortes concentrations de sesquiterpènes, plus particulièrement les

carboxyeudesmanadiènes dans les feuilles. Les travaux d'Abu Zarga et al. (1998 et 2002) ont révélé la présence de 6 nouveaux sesquiterpènes de type eudesmane. Khalil et al. (2007) ont constaté que *Inula viscosa* (L.) est dépourvue d'alcaloïdes et d'antraquinones.

L'étude menée par Nisreen et al. (2001), Aouinty et al. (2006), Zeggwagh et al. (2006), Del Mar Herrador et al. (2008) et Kattouf et al. (2009) sur les parties aériennes de *Inula viscosa* (L.), a révélé respectivement les résultats suivants: un effet abortif prononcé, une toxicité contre les larves de moustiques culicidés "*Culex pipiens*", un effet hypoglycémique, un effet antihypertenseur et un effet antimigraine et anticancer.

Les aglycones flavoniques de *Inula viscosa* (L.) ont été étudiés et testés dans différents domaines, ce qui a révélé les activités suivantes : anti-inflammatoire (Máñez et al., 1999; Hernández et al., 2007), antioxydante (Ortal et al., 2009) et sur l'induction géotropique de la croissance racinaire.

D'après les résultats de Cafarchia et al. (2002); Silva et al. (2002) les huiles essentielles de cette plante ont des effets antifongiques vis-à-vis de *Aspergillus flavus*; *Rhizopus stolonifer*; *Trichoderma sp* et *Fusarium sp* et antibactérienne sur *Helicobacter pylori*.

Romano (1997) a recherché un milieu de culture idéal pour l'induction callogène et le développement des plantules de *Inula viscosa* (L.) obtenues sur un milieu MS enrichi de BAP à différentes concentrations. Ce milieu est finalement le milieu B5 additionné de 1mg. L⁻¹ de 2, 4-D et 0.1 mg. L⁻¹ de kinétine sous 16 h de photopériode.

2. Les composés phénoliques

2.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.

Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles.

Plusieurs auteurs rapportent qu'en général ces composés ne sont pas présents à l'état libre dans la nature mais sous forme de combinaisons de type ester ou hétérosides (Paris et Duret, 1972; Bell et Charl, 1980; Vercauterne, 1996).

2.2. Classification des composés phénoliques

A l'heure actuelle, plus de 8000 composés naturels satisfaisant aux critères des polyphénols ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent dans différentes familles : acides phénols, lignanes, tanins, flavonoïdes, xanthones, quinones ...

Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire est comprise entre 500 et 30000 Daltons (Harborne, 1993).

2.2.1. Formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15; ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

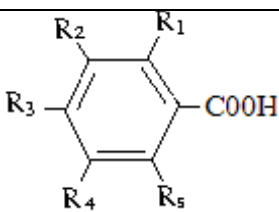
2.2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénols sont définis par l'existence d'un seul noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxylés. Ils se trouvent en général à l'état combiné (sous forme de liaison ester ou osidique) chez les végétaux. Ils appartiennent à deux groupes: les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

a. Les acides hydroxybenzoïques

Ces composés dérivent de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type : C6-C1.

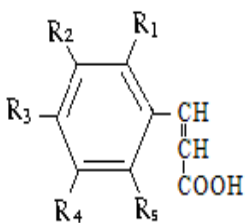
Tableau 2. Les groupes d'acides phénols dérivants de l'acide hydroxybenzoïque

Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	H	H	H	H	Acide Benzoïque (non phénolique)
	H	H	OH	H	H	Acide Para-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	H	Acide Protocatéchique
	H	OCH3	OH	H	H	Acide Vanillique
	H	OH	OH	OH	H	Acide Gallique

b. Les acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base est en C6-C3.

Tableau 3. Les groupes d'acides phénols dérivants de l'acide hydroxycinnamique.

Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	H	H	H	H	Acide Cinnamique (non phénolique)
	H	H	OH	H	H	Acide P-coumarique
	H	OH	OH	H	H	Acide Caféique
	H	OCH3	OH	H	H	Acide Férulique
	H	OCH3	OH	OCH3	H	Acide Sinapique

* Les coumarines

Ce sont des dérivés de la benzo α pyrane; c'est la lactane de l'acide O-hydroxy cinamique. Elles possèdent un hétérocycle oxygéné à 5 atomes de carbone reliés à un noyau benzénique (**Figure 5**).

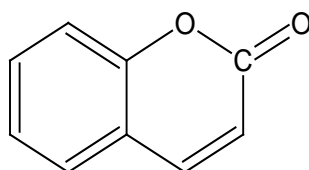


Figure 5. Formule générale d'une Coumarine.

Les coumarines à l'état naturel, existent non seulement sous forme hétérosidique mais aussi sous forme libre; celle-ci peut constituer les principes actifs de nombreuses plantes (Gazengel et Orcchioni, 2001).

2.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Présents dans tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux).

Ils dérivent tous de la flavone (ou phényl-2-chromone) et existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides "les flavonosides" (Ghestem et *al.*, 2001). Les oses qui interviennent dans leur structure sont uniquement des aldoses, le D- glucose est le glucide le plus fréquent. Les flavonoïdes se distinguent par une structure commune en C6-C3-C6', dans laquelle deux noyaux benzéniques (A et B) sont reliés par un élément en C3 différent selon la nature des flavonoïdes (Ribereau- Gayon, 1968) (**Figure 6**).

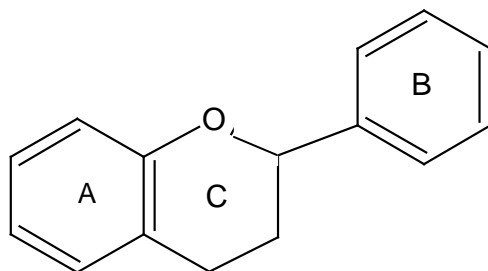
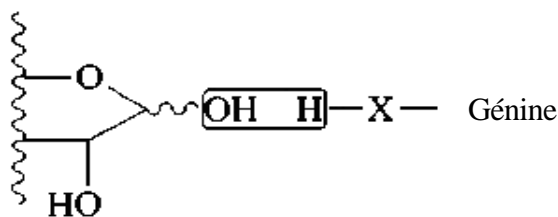


Figure 6. Squelette de base des flavonoïdes.

a. Les hétérosides flavoniques

Les hétérosides (ou glycosides) sont des composés résultant de la condensation du groupement hémiacétalique d'un ose avec une substance non glucidique appelée génine ou aglycone.



Selon la nature de l'atome de la génine portant l'hydrogène qui se condense avec l'hydroxyle hémiacétalique de l'ose, nous différencions les groupes suivants :

- les O-hétérosides (union du sucre avec un groupement hydroxyle, alcool ou phénol).
- les S-hétérosides (union du sucre avec un groupement thiol de la génine).
- les N-hétérosides (union du sucre avec un groupement amine de la génine).
- les C-hétérosides (union du sucre avec la génine par une liaison C-C) (Ghestem et *al.*, 2001).

Les O-hétérosides sont les plus largement répandus dans le règne végétal (Gazengel et Orcchioni, 2001).

Les C-hétérosides ont une très solide liaison entre la génine et l'ose. Ils ne sont hydrolysables ni par les acides, ni par voie enzymatique; seule une oxydation permet la séparation génine-ose (Guignard, 2000).

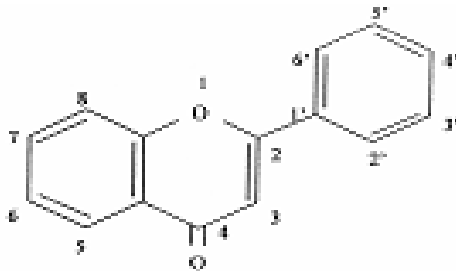
Les hétérosides forment un groupe très important en pharmacognosie. Leur activité est essentiellement due à la génine, mais la partie osidique intervient notablement au niveau de l'absorption tissulaire; elle est le plus souvent nécessaire pour l'action in situ. En revanche chez le végétal le rôle est encore assez mal connu; leur utilité peut être évoquée dans des mécanismes de défense et de détoxication "stress".

b. Les aglycones flavoniques

*** Flavones, flavanones, flavonols et dérivés voisins**

Ils sont abondants au niveau des tiges et des feuilles, mais assez rares au niveau des graines et des racines (Ribereau- Gayon, 1968).

- **Les flavones** : dérivées de la phényl-2-chromone. Il existe deux composés, largement répandus chez les Angiospermes: l'Apigénine et la Lutéoline (Ribereau- Gayon ,1968).

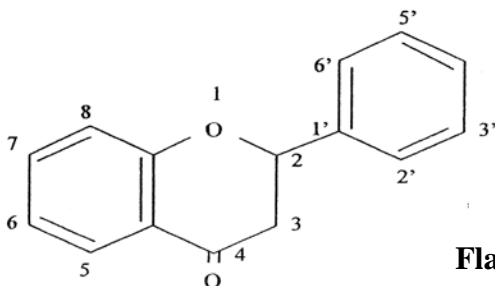


Lutéoline: Hydroxylation : 5, 7, 3', 4'

Apigénine: Hydroxylation : 5, 7, 4'

Flavone

- **Les flavanones** : Ils dérivent des flavones par disparition de la double liaison de l'hétérocycle central (Ribereau- Gayon, 1968).

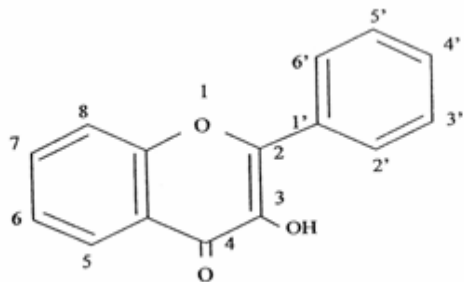


Hespérétol: Hydroxylation : 5, 7, 3', 4'=OCH₃

Naringénine: Hydroxylation : 5, 7, 4'

Flavanone

- **Les flavonols** : se différencient des flavones par l'existence d'un hydroxyle en position 3, les trois principales structures sont le Kaempférol, la Quercétine et le Myricétine (Ribereau-Gayon, 1968).



Kaempférol : Hydroxylation : 5, 7, 4'

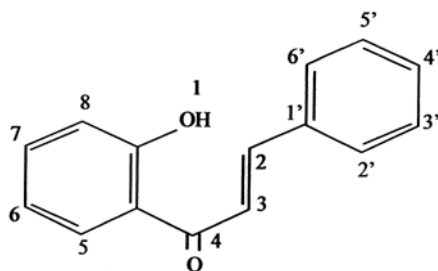
Myricétine : Hydroxylation : 5, 7, 3', 4', 5'

Quercétine : Hydroxylation : 5, 7, 3', 4'

Isorhamnétine: Hydroxylation : 5, 7, 4', O CH₃=3'

Flavonol

- **Les chalcones** : (du grec chalcos : cuivre), sont des pigments jaunes des fleurs, leur coloration vire au rouge ou rouge orangé en présence d'ammoniaque. ce sont des isomères des flavanones à cycle pyronique ouvert (Gazengel et Orcchioni, 2001).



Chalcone

c. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos : fleurs et kianos : bleu violet) sont des pigments végétaux hydrosolubles, colorés selon le PH en rouge, violet ou bleu en milieu acide ou bleu mauve en milieu alcalin. Les anthocyanes dérivent du noyau flavylum (Audigie et Zonzain, 1991).

Les anthocyanes sont très répandus dans le règne végétal sous forme d'hétérosides (anthocyanosides). On les trouve dans de nombreuses fleurs, fruits mûrs, parfois feuilles auxquels ils confèrent leur couleur. La lumière et le froid augmentent leur formation (Gazengel et

Orcchioni, 2001). Ils s'accumulent dans la vacuole des cellules les plus externes (épiderme et hypoderme) (Guignard, 2000).

Les anthocyanes ont une structure en C6-C3-C6 (**Figure 7, tableau 4**). L'élément en C3 est sous forme d'ion pyrylium (dans lequel l'oxygène a une structure d'oxonium ionique) (Ribereau-Gayon, 1968; Gazengel et Orcchioni, 2001).

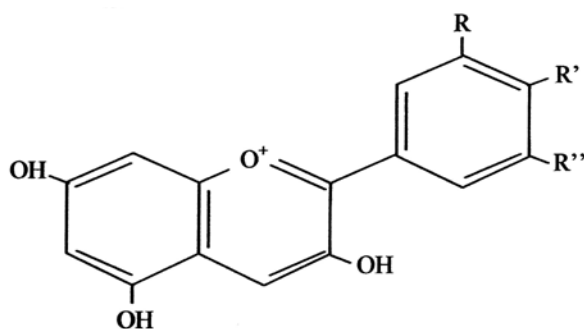


Figure 7. Squelette de base des anthocyanes.

Tableau 4. Principaux anthocyanidols entrants dans la structure des anthocyanes.

Génine	R	R'	R''
Cyanidol	OH	OH	H
Delphinidol	OH	OH	OH
Pétunidol	OCH3	OH	OH
Malvidol	OCH3	OH	OCH3

2.2.2. Formes condensées (les tanins)

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides) (Ghestem et *al.*, 2001).

On les rencontre dans les vacuoles des cellules, souvent combinés à d'autres substances: alcaloïdes, protéines, oses (tanosides) (Paris et Moyse, 1976).

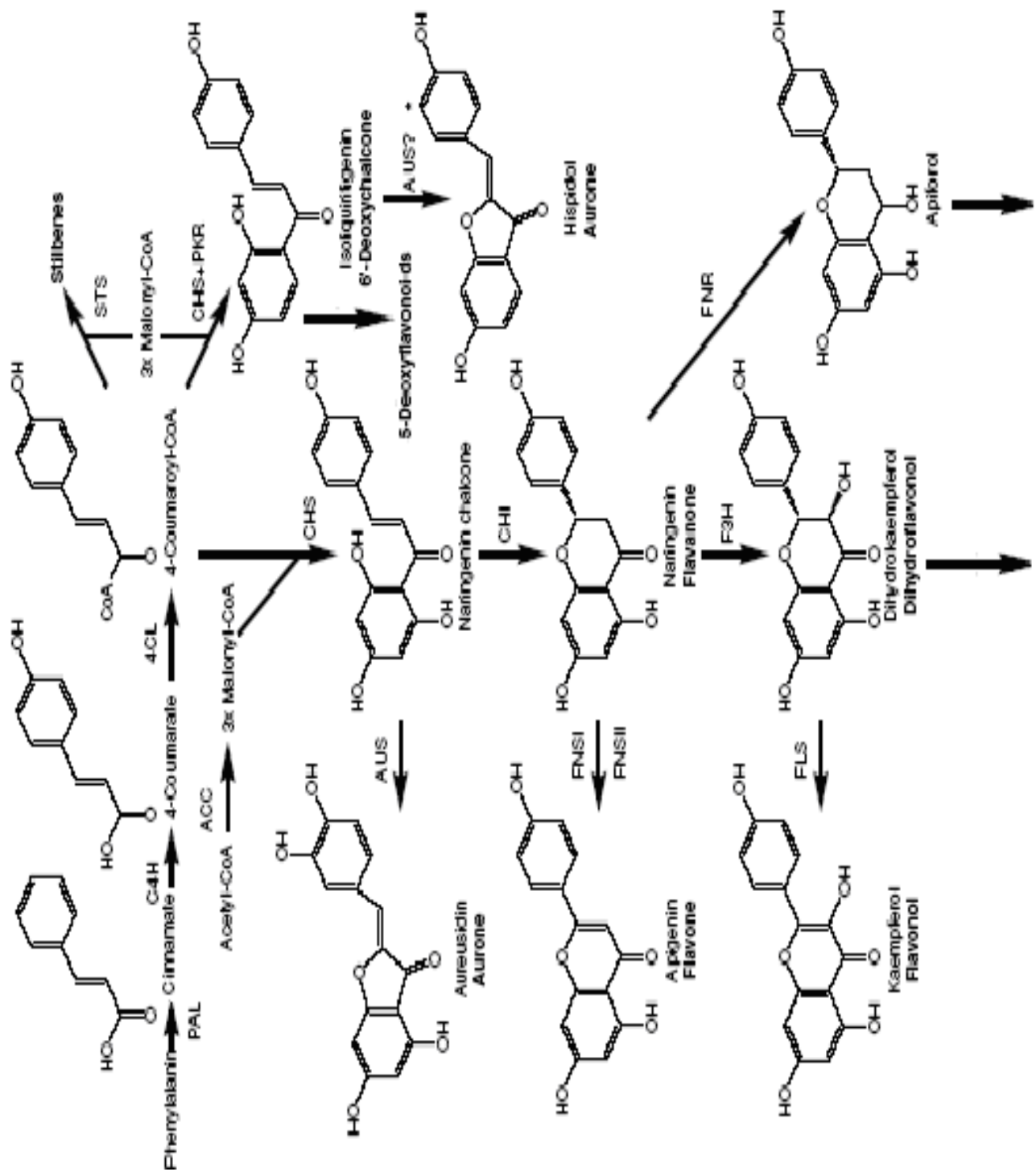
Selon Paris et Hurabielle (1980), les tannins sont divisés en deux groupes d'après leurs constitutions chimiques: les tanins hydrolysables et les tanins condensés ou catéchiques.

2.3. Métabolisme des flavonoides

La synthèse de ces composés implique le croisement de 2 voies biochimiques, la voie shikimate pour la formation du noyau B, et la voie malonate concernant le noyau A (Swain., 1974).

La voie mixte ainsi initiée commence par la fixation de 3 unités malonyl-COA (3 x C₂-COA) successivement sur le 4-coumaroyl-COA (C₆C₆-COA).

Les premiers composés formés sont constitués par un équilibre chalcone-flavanone, lequel est déplacé en faveur de la flavanone. Les chalcones, se transformant donc par isomérisation (cyclisation) en flavanones, sont des précurseurs des flavones et des flavonols (Markam, 1982; Andersen et Markham, 2006) (**Figure 8**).



2.4. Propriétés biochimiques

2.4.1. Les aglycones flavoniques

Les différents aglycones se distinguent fondamentalement par leur degré d'oxydation qui varie essentiellement suivant:

- la présence ou non de double liaison sur l'hétérocycle.
- la présence ou non d'une fonction carbonyle sur l'hétérocycle.
- le nombre et la position de groupements hydroxyles sur l'aglycone.

Les aglycones phénoliques ainsi obtenus démontrent une grande faculté de substitutions qui peut modifier fortement leurs propriétés de solubilité (William's et Harborne, 1993).

Les groupes OH présents sur l'aglycone ont une grande faculté à se libérer de leur proton et de ce fait ils accroissent la densité électronique sur le cycle benzénique. Par conséquent, ils augmentent l'aptitude de ce cycle à donner des réactions de substitutions surtout en position méta.

2.4.2. Les hétérosides flavoniques

La glycosylation est particulièrement importante dans les milieux biologiques car elle solubilise le flavonoïde et le rend physiologiquement stable. Ces hétérosides sont de deux types: des O-glycosides ou des C-glycosides.

Les O-glycosides: la partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. Les monosides sont formés avec des D-aldooses (D-glucose et D-galactose), des pentoses (D-apiose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose) ou avec les acides D-glucuronique et D-galacturonique. La variabilité structurale augmente avec les hétérosides dont la partie osidique est un disaccharide ou un tri saccharide qui peut être linéaire ou ramifié.

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un quelconque des hydroxyls phénoliques de la génine mais, en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont impliqués.

Les C-glycosides: on en connaît plus de 300, la liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre (c'est souvent le glucose mais ce peut être le galactose ou un pentose) et le carbone en 6 ou en 8 de la génine si elle est souvent flavonique, peut aussi bien être d'un autre type flavonol, chalcone.

On distingue plusieurs types de structure:

- les mono-C-glycosyl flavonoïdes.
- les di-C-glycosyl flavonoïdes.

- les C-glycosyl-O-glycosyl flavonoïdes.
- les acyl-C-glycosyl flavonoïdes.

Il faut noter que l'hétérocycle des dérivés du type 5-hydroxy-C-glycosyl flavones s'ouvre facilement en milieu acide. Ce qui explique qu'il s'isomérisent aisément ($6 \leftrightarrow 8$, $8 \leftrightarrow 6$). Cette isomérisation, dite isomérisation de Wessely-Moser, conserve un intérêt pour l'étude structurale de ces composés (Brunton, 1999).

L'acylation a été moins étudiée que les autres substitutions. Néanmoins, des propriétés antioxydantes très intéressantes chez les flavonoïdes acylés (Alluis et Dangles, 1999). Ces auteurs ont montré que la présence d'acyles donne à l'hétéroside flavonique une conformation qui augmente remarquablement sa capacité à complexer les métaux lourds ou les protéines.

Toutes ces substitutions confèrent à la molécule des propriétés chimiques et physiologiques variées. A ce propos, plusieurs activités ont été attribuées aux flavonoïdes (Lacaille - Dubois et Wagner, 1996).

* Activité antiinflammatoire liée à l'inhibition de la cyclo-oxygénase, et accrue par la lipophilie des molécules.

* Activité antivirale liée à une inhibition de transcriptase inverse; dans ce contexte, des activités anti-HIV-RT ont été révélées pour divers flavones (Ono et *al.*, 1990).

* Activité antimicrobienne et antifongique (Rosa et *al.*, 2003).

2.5. Rôles et intérêts des polyphénols

La diversité structurale des polyphénols leur permet d'agir à différents niveaux notamment dans la physiologie des êtres vivants et pour l'industrie de différents domaines.

2.5.1. Intérêts thérapeutiques

Grâce à leur richesse en groupements hydroxyles, les flavonoïdes jouent un rôle très important dans les réactions d'oxydo-réduction dans les liaisons métalliques complexes et peuvent agir sur les équilibres enzymatiques en se fixant sur certaines protéines et enzymes. Ils ont aussi diverses activités dans le domaine médical puisqu'ils constituent une matière importante dans la fabrication de plusieurs médicaments (Heywood et *al.*, 1997; Jay et *al.*, 2005).

Les expériences pharmacologiques ont prouvé que les flavonoïdes ont des effets anti-inflammatoires, capillaro-protecteurs, ce sont aussi de bons contraceptifs oestrogéniques, des

analgésiques, des antiulcéreux, des hypocholestérolémiants, des diurétiques et des anti-cancérigènes et possèdent la propriété vitaminique P (Gazengel et Orecchioni, 2001).

Selon Rosler et Goodwin (1984), les flavonoides pourraient être utilisés dans les traitements des cataractes d'origine diabétique ou le traitement de la galactosémie en raison de leur action inhibitrice sur l'aldose réductase qui convertie le D-glucose et D-galactose en sorbitol.

La rutine et ses dérivés ainsi que l'hespéridine agissent contre les œdèmes, les hémorragies et les hémorroïdes (Bezenger - Beauquesne, 1987).

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoides, la propolis des abeilles qui a des propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses contient la chrysin, la quercétine et la galangine. Les insectes utilisent les propriétés antifongiques et antibactériennes de ces flavonoides pour aseptiser leurs ruches et en colmater les fentes (Trouillas et *al.*, 2005; Makris et *al.*, 2006; Narendes et *al.*, 2006).

A certains acides phénols on attribue des propriétés antibactériennes, antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Ce sont aussi des anticoagulants, anti-allergiques, antiviraux, anti-inflammatoires et antiseptiques urinaires et enfin des inhibiteurs enzymatiques.

L'acide coumarique et férulique sont anticoagulants et antifongiques (Bruneton, 1993).

L'acide caféique et l'acide benzoïque ont une activité antibactérienne (Didry et *al.*, 1982).

L'acide caféique a une activité hypertensive, il est également utilisé comme analgésique en pharmacologie (Andray, 1993).

2.5.2. Rôle et intérêt biologique dans le règne végétal

Les flavonoides produits d'accumulation qui pendant longtemps ont été considérés comme composés métaboliques secondaires inactifs, sont actuellement reconnus comme métabolites ayant une grande importance dans les processus biochimiques et physiologiques des plantes (Seigler, 1977).

Les flavonoides sont des pigments hydrosolubles associés à la chlorophylle et aux caroténoïdes. Ils sont responsables de la plupart des colorations rouge, bleue et violette des organes végétaux et dans certains cas des colorations jaunes. Les flavonoides les plus impliqués dans ce rôle sont les anthocyanes, les flavones et les composés voisins (Judd et *al.*, 2002).

Les composés phénoliques interviennent dans la maturation des fruits et dans le comportement des plantes vis-à-vis des agressions et de stress. Une autre propriété des polyphénols est la

protection des plantes contre les rayonnements destructeurs grâce à leur absorption en UV (Brouillard et *al.*, 1995).

D'autre part, certains isoflavonoïdes jouent un rôle important dans la formation des nodules chez les espèces qui sont en symbiose avec le genre *Rhizobium* (Gerhard, 1993).

Les flavonoïdes accumulés dans les cires, les cuticules foliaires, les exsudats des bourgeons ou encore dans le cœur du bois constituent une barrière à l'invasion des microorganismes (French et Tozersg, 1992).

2.5.3. Rôle et intérêt biologique pour l'homme

En chimiotaxonomie "science qui se propose d'apparenter les taxons sur la base de leur composition biochimique", les flavonoides ont été signalés par plusieurs auteurs comme étant de bons indicateurs systémiques des plantes (Bate – Smith et *al.*, 1954).

2. 6. Mode d'action des polyphénols vis-à-vis des microorganismes

Le mécanisme d'action des polyphénols au niveau des cellules microbiennes s'établit par une réaction avec la membrane plasmique ou par l'inactivation des enzymes essentielles ou par combinaison (Bickley, 1991).

En 1981, Davidson et Branden, ont montré que tous les polyphénols, excepté les flavonols, ont un effet bactériostatique sur *Staphylococcus aureus*.

Les 3-deoxyanthocyanidins ont une grande efficacité vis-à-vis des bactéries et des champignons. L'apigeninidine inhibe significativement la croissance du *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae*, *Gliocladium roseum*, *Alternaria solani*, et *Phytophthora infestans*. De même elle inhibe le développement de certaines bactéries Gram+ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, et *Streptococcus faecalis*. Par contre une faible étendue est marqué vis à vis des bactéries Gram- *Escherichia coli*, *Serratia marzens*, et *Shigella flexneri* (Schutt et Netzly, 1991; Stonecipher et *al.*, 1993).

En 1993, Tassou, a étudié l'effet des polyphénols sur *Pseudomonas aeruginosa* et a déclaré qu'ils réagissent en premier avec le composé phospholipidique de la membrane cytoplasmique causant ainsi une augmentation de la perméabilité cellulaire. Il a également rapporté que les phénols provoquent le gonflement de cette bactérie.

Ce même auteur a déclaré que chez *Escherichia coli* les polyphénols attaquent la membrane avec affection de l'activité de ses enzymes essentielles "déshydrogénase et oxydase".

3. Les microorganismes à tester

Plusieurs maladies humaines et phytopathologiques sont causées par divers organismes comme les bactéries, les champignons, les levures, et les virus. Vu l'apparition de nombreux cas de résistances aux antibiotiques utilisées en thérapie. La recherche d'autres molécules surtout naturelles à activité antibiotique à été initiée pour lutter contre les agents pathogènes.

Pour étudier les propriétés antagonistes des polyphénols extraits de *Inula viscosa* (L.) plusieurs germes cibles (bactéries, champignons et levures) ont été utilisé pour leur antibiogramme.

3.1. Bactéries

3.1.1. Bactéries gram +

Staphylococcus aureus: (Staphylos= grappe; aureus= doré) ce sont des cocci aérobies ou anaérobies, de la famille des Micrococcaceae. Il est très fréquent chez l'homme à l'état commensal ou comme pathogène, responsable des infections cutanées et sous-cutanées (folliculite, furoncle, panaris, anthrax). *S. aureus* est aussi responsable des mastites chez les femmes qui allaitent. Tient également une place dominante dans les infections osseuses primitives et des atteintes pulmonaires et bronchites (Frobisher, 1976).

Micrococcus luteus: ce sont des cocci aérobies ou anaérobies facultatifs de la famille des Micrococcus, sont considérés comme peu ou pas pathogène (Frobisher, 1976).

Bacillus cereus: ce sont des bacilles aérobies de la famille des Bacillaceae. Ce Sont des espèces inoffensives et utiles retrouvées dans la terre et la poussière, ils ont peu d'importance clinique mais peuvent s'avérer un indicateur utile de manque d'hygiène en se multipliant de façon éhontée dans un milieu soit -disant stérile (Frobisher, 1976).

3.1.2. Bactéries gram -

Escherichia coli: ce sont des bacilles anaérobies facultatifs, de la famille des Enterobacteriaceae; commensale du tube digestif. Responsable des gastro-entérites (diarrhée), des infections urinaires, néonatales et nosocomiales. C'est la bactérie pathogène la plus fréquemment retrouvée, tendance vers l'acquisition de la résistance aux antibiotiques (Flandrois, 1997).

Pseudomonas aeruginosa: ce sont des bacilles aérobies strictes, de la famille des Pseudomonadaceae, forment des colonies grandes isolées avec un contour irrégulier caractérisés par un pigment vert qui envahit fréquemment les tissus endommagés. Les infections par cette espèce deviennent de plus en plus une source de problèmes dans les hôpitaux car ne répondant

pas aux antibiotique les plus anciens, parmi les antibiotiques plus récemment mis sur le marché sont la gentamycine, la tobramycine, et la butirosin. (Bergogne- Berzin, 2002; Frobisher, 1976).

Klebsiella pneumoniae: ce sont des bacilles aérobies facultatifs, de la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des pathogènes transmis par voies digestive ou urinaire (Frobisher, 1976).

3.2. Levures

Les levures sont des champignons microscopiques se présentent sous forme unicellulaires au moins à un stade de leur cycle biologique (Bourgeois et Leveau, 1980).

Saccharomyces cerevisiae: de la famille des Saccharomycetacées, classés sous le groupe des ascomycètes, elle est responsable du gonflement du pain. La longue exposition à cette levure peut aboutir à une hypersensibilité (Yamamoto et *al.*, 2002).

Candida albicans: de la famille des Cryptococcucées, c'est un champignon Luviriforme unicellulaire, de taille moyenne, sporulant. Sur la gélose de Sabouraud, les colonies sont plates assez denses de couleur blanchâtre à beige, d'aspect laiteux.

Il est responsable des maladies cutanées, allergisantes telles que la candidose, des dermatoses diverses et la teigne (Berche et *al.*, 1989).

3.3. Champignons

Fusarium oxysporum (Schlecht) SN. et H. groupe les tuberculariacées (champignons imparfait) très fréquent dans les sols et par conséquent saprophyte actif, il joue aussi un rôle important en pathologie végétale. En effet, on compte actuellement pour cette espèce, 66 formes spécialisées qui présentent une virulence particulière pour la plante qu'elles parasitent (Messian et Cassini, 1968).

Le ***Fusarium oxysporum f sp albedinis*** (Killian et Maire) Malençon est la forme de l'espèce oxysporum qui s'attaque au Palmier Dattier. L'infection a lieu dans le sol par les racines et le champignon progresse des racines aux palmes en empruntant le système vasculaire (Bulit et *al.*, 1967).

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur les feuilles de trente cinq individus différents de *Inula viscosa* (L.).

Les plantes ont été récoltés dans la région de Thénia (Wilaya de Boumerdès) en automne (Septembre -Novembre) 2008.

Thénia est une ville très ancienne appelée auparavant Ménerville (**Figure 9**). Elle se situe 10 km à l'Est de la Wilaya de Boumerdès, avec une altitude de 301 m. Sa surface est de 42.3 Km².

Son climat est méditerranéen, le mois d'Octobre est caractérisé par une pluviométrie de 250 à 300 mm/an avec une moyenne de température qui varie de 18 à 22°C

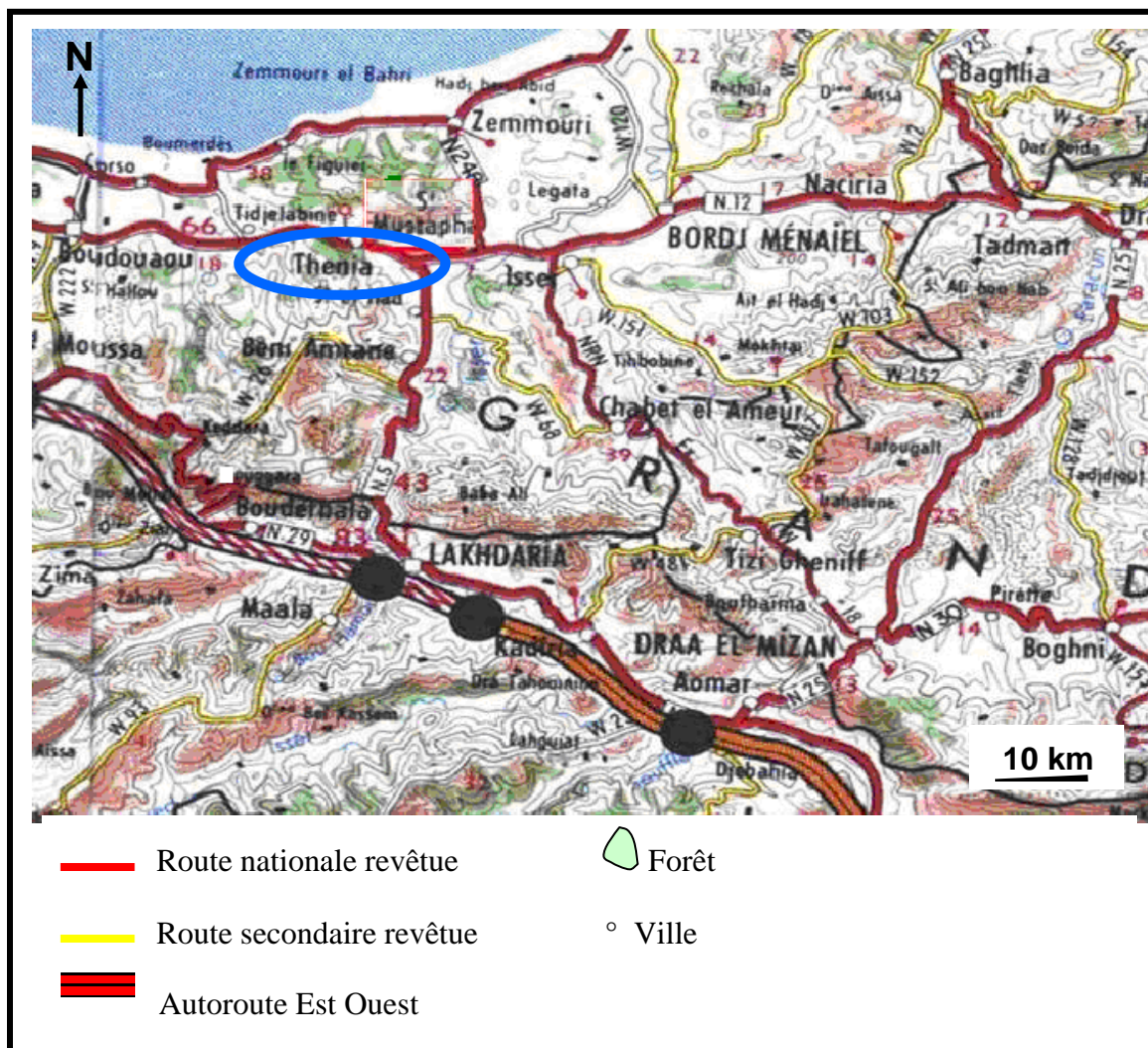


Figure 9. Carte géographique représentant la zone de récolte (carte Michelin).

Le matériel végétal récolté est séché à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité dans du papier journal pour éviter le développement des moisissures. Il est ensuite broyé finement et conservé dans un endroit sec.

1.1.2. Matériel microbiologique *

Les tests antibactériens et antifongiques ont été réalisés sur les souches suivantes:

-les bactéries Gram +

- *Staphylococcus aureus ATCC 6538*
- *Bacillus cereus ATCC 10876*
- *Micrococcus luteus ATCC 533*

-les bactéries Gram -

- *Escherichia coli ATCC 4157*
- *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*
- *Klebsiella pneumonia ATCC 4352*

-les levures

- *Saccharomyces cerevisiae ATCC 2601*
- *Candida albicans ATCC 24433*

- les champignons

- *Fusarium oxysporum f sp albedinis***

1.1.3. Animaux *

Les tests pharmacologiques ont été réalisés sur les espèces suivantes:

1-souris albinos (*Mus musculus*) à 25g ± 5g.

2- rats albinos (*Wistar*) à 200 g ± 20 g.

*Régime alimentaire :

(alimentation : granulés; boisson : eau de ville)

*Conditions d'élevage :

(température : 20 à 24 °C; humidité : 50 à 65 %; éclairage : 12 h/j.)

1.2. Matériel non biologique : le matériel non biologique utilisé (milieux de culture, antibiotiques et médicaments) est présenté en **annexe 1 et 2**.

* Le matériel microbiologique et les animaux provient de SAIDAL. **La souche de *Fusarium oxysporum f sp albedinis* provient du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et valorisation de la biomasse (ENS de Kouba). Cette dernière a été isolée à partir d'un rachis de palmier dattier infecté.

2. Méthodes

2.1. Méthodes d'extractions des composés phénoliques

A cause de la grande diversité structurale il en découle une grande variabilité des propriétés physio-chimiques rendant impossible une présentation unique et générale d'une méthode permettant l'extraction et l'isolement des polyphénols (Vercauterne, 1996).

Le protocole suivi dans notre travail a été mis au point par Lebreton en 1967 à partir du schéma initial de Bate - Smith en 1954, il a été modifié par Ouafi (2007).

2.1.1. Extraction hydrolytique

Les principales étapes du protocole consistent en:

- une hydrolyse chlorhydrique à chaud du matériel végétal qui provoque la libération des aglycones flavoniques de leur O-glycosides.
- un épuisement de la phase aqueuse hydrolytique par l'éther diéthylique qui permet l'extraction et le dosage des aglycones et qui laisse les anthocyanidines et les C-glycosides en phase aqueuse.

Pour cela, un gramme de poudre végétale est déposé avec 80 ml d'acide chlorhydrique à 2 N. Le mélange est porté au bain marie à 40°C pendant 40 mn avec insufflation d'air toutes les 10 mn. L'insufflation d'air a pour but de transformer les proanthocyanidines en anthocyanidines par oxydation. Après refroidissement, le décocté est transféré dans une ampoule à décanter dans laquelle on procède à 3 bains d'éther successifs à raison de 50 ml chacun.

A chaque extraction, deux phases apparaissent : l'une supérieure dite épiphase et l'autre inférieure dite hypophase.

* **Epiphase étherée:** phase de couleur jaune-verdâtre contenant les flavones-flavonols et les acides phénols. Elle est récupérée après chaque bain et mise à évaporation sous hotte ventilée. Le résidu sec est récupéré dans 5 ml de méthanol.

* **Hypophase acide:** de couleur brune, renfermant les C-glycosides et les anthocyanes. Cette phase est additionnée à 50 ml de n-butanol. La décantation dure 30 mn.

L'épiphase est séchée sous hotte ventilée et récupéré avec 5 ml de méthanol.

Ces deux extraits sont conservés au frais pour une analyse quantitative par spectrophotométrie UV visible et une analyse qualitative par : chromatographie sur couche mince (C.C.M), chromatographie sur papier (C.P) et par chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P). Des tests microbiologiques sont également réalisés (**Figure 10**).

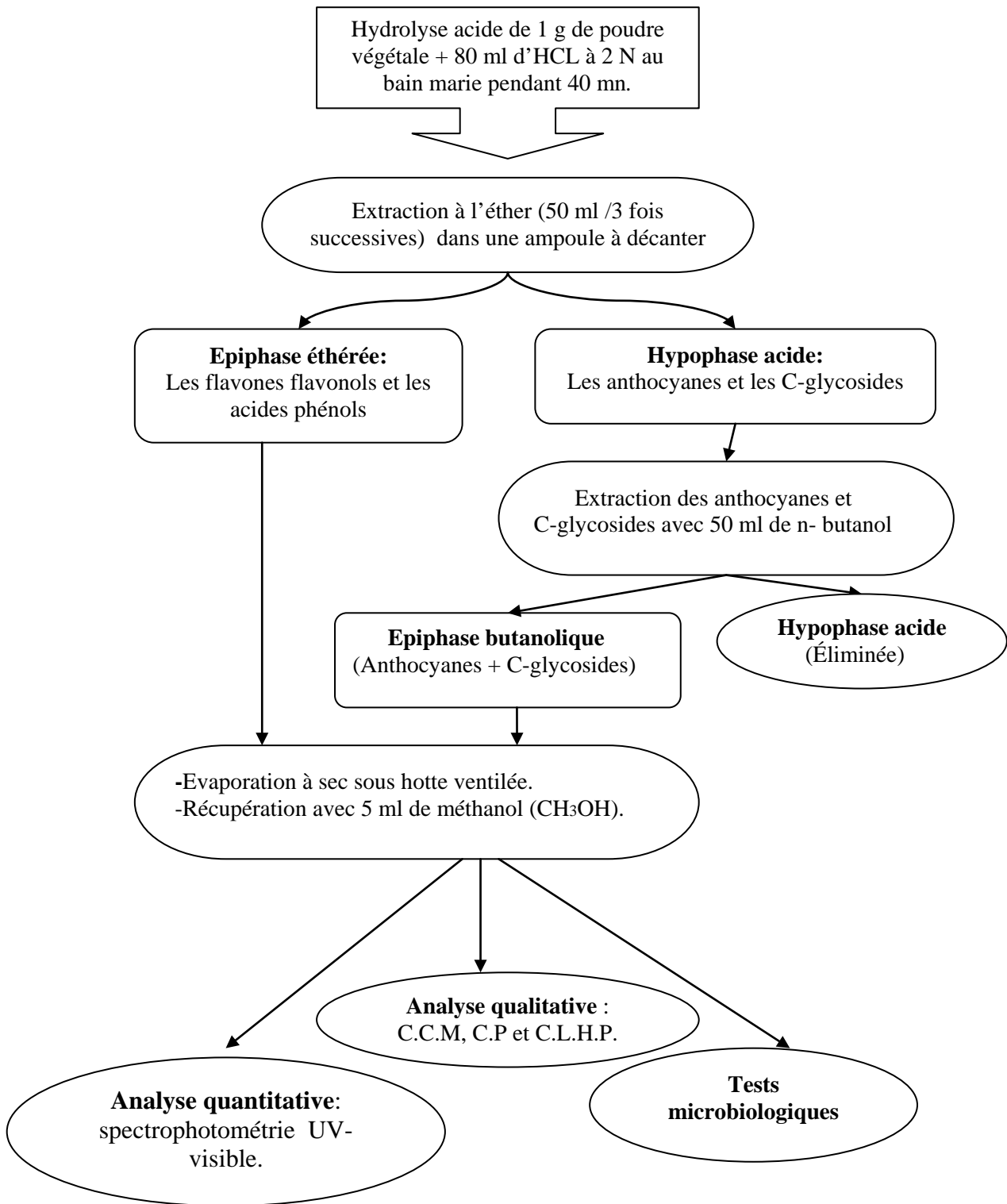


Figure 10. Protocole expérimental d'extraction, de dosage et d'identification des flavones flavonols , acides phénols , anthocyanes et C-glycosides de *Inula viscosa* (L.), selon Lebreton (1967) modifié par Ouafi (2007).

2.1.2. Extraction des aglycones libres (Ouafi, 2007)

Dans un bécher, 1 g de poudre végétale est mis à macérer dans 50 ml d'éther diéthylique. Cette macération dure environ 30 mn. La phase étherée contenant les aglycones libres est récupérée dans une boîte de Petri et évaporée sous hotte ventilée. Le résidu est récupéré dans 5 ml de méthanol puis conservé au frais pour une analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible et une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (C.C.M) et par chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P) ainsi que des tests microbiologiques (Figure 11).

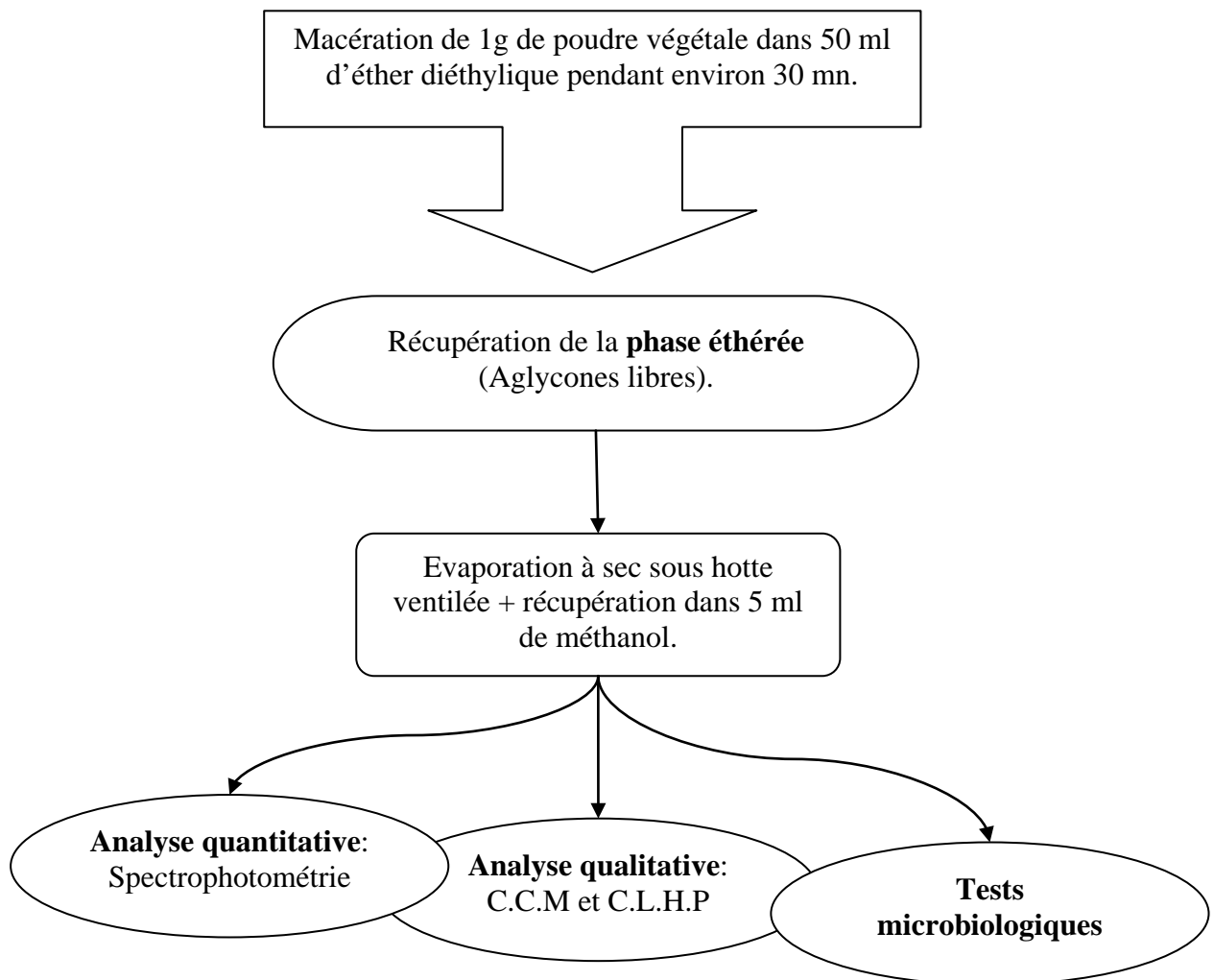


Figure 11. Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres de *Inula viscosa* (L.) selon Ouafi (2007).

2.1.3. Extraction des hétérosides flavoniques, macération hydro-éthanolique (Harborne, 1973).

Dans un bécher, à 1 g de poudre végétale est additionné 100 ml d'éthanol à 70° pendant 48 h. Le mélange est séché dans un rotavapeur. Le résidu sec est récupéré dans 100 ml d'eau distillée bouillante. Après refroidissement, le mélange est décanté avec 50 ml de n-butanol. Deux phases apparaissent (Harborne, 1973):

* **une hypophase aqueuse** de couleur brunâtre qui est éliminée.

* **une épiphase butanolique** de couleur verdâtre contenant les hétérosides flavoniques et qui est évaporée à sec sous hotte ventilée. L'extrait sec est récupéré avec 5 ml de méthanol pour les dosages quantitatifs et les tests microbiologiques, et dans l'eau distillée (7ml) pour le test antiulcérogénique (**Figure 12**).

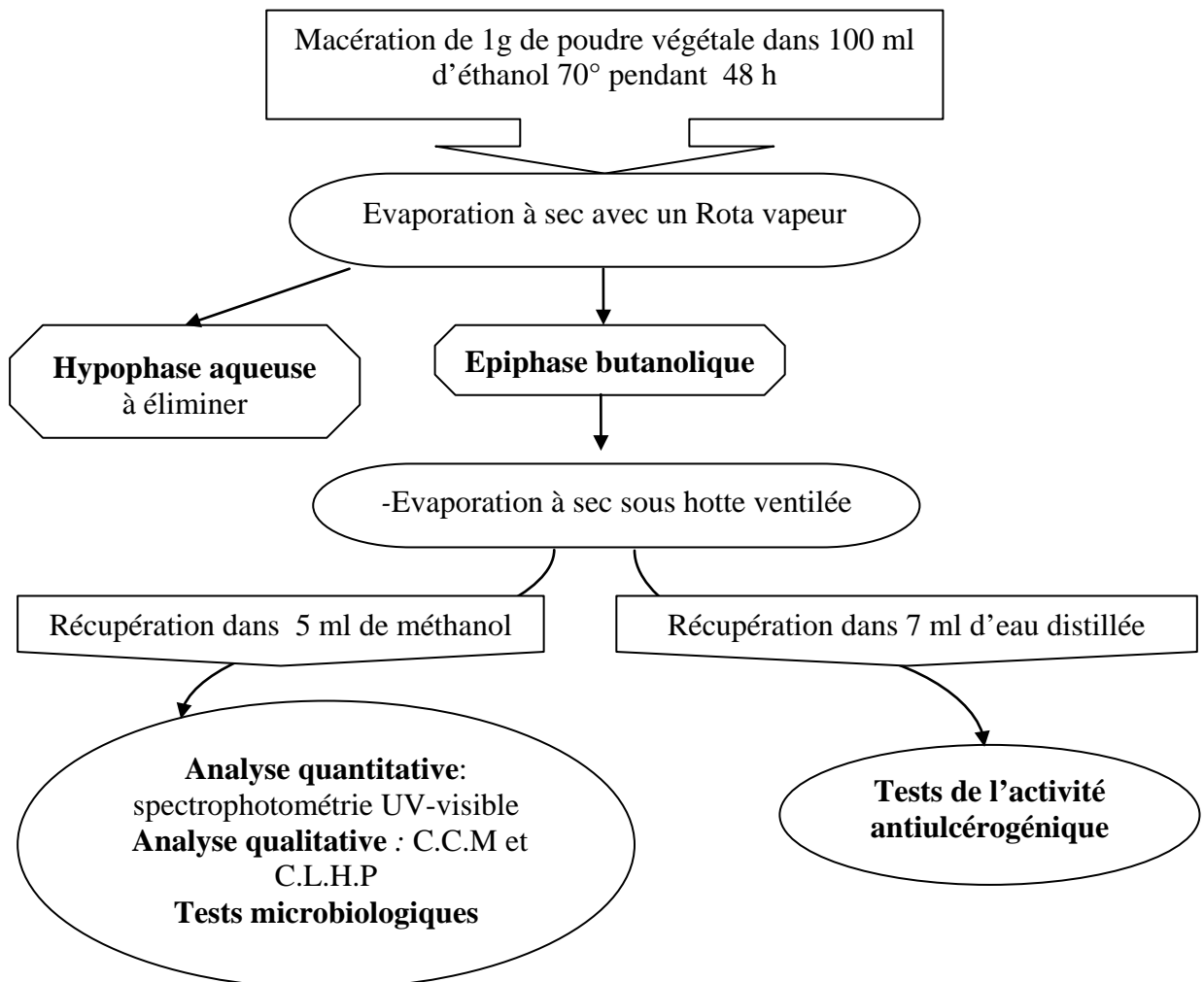


Figure 12. Protocole expérimental d'extraction, de dosage et d'identification des hétérosides flavoniques de *Inula viscosa* (L.), par macération hydro-éthanolique Selon Harborne. (1973).

2.2. Techniques d'analyse

2.2.1. Analyse qualitative

2.2.1.1. Chromatographie sur couche mince (C.C.M) et sur papier (CP)

a. Principe

C'est la technique de séparation la plus simple. Elle se base sur différents principes physico-chimiques.

La Chromatographie sur Couche Mince est un exemple de chromatographie solide-liquide où le phénomène d'adsorption peut être considéré comme prédominant. Chaque soluté est soumis à deux forces :

- ❖ une force d'entraînement par adsorption sur l'absorbant fixe polaire.
- ❖ une force d'entraînement par l'éluant plus ou moins apolaire. L'éluant est composé d'un solvant vecteur peu polaire et peu visqueux et d'un solvant actif plus ou moins polaire dont il faut rechercher la proportion idéale pour obtenir une bonne séparation des solutés (Gavrilocic et *al.*, 1996).

La C.C.M permet le contrôle de façon aisée et rapide de la pureté des composés organiques une fois les conditions opératoires connues et indique ainsi le nombre de composants d'un mélange.

L'originalité de la C.C.M tient au fait que la phase stationnaire est déposée en un film de faible épaisseur sur un support inerte et rigide (Mahuzier et *al.*, 1999).

b. Mode opératoire

Au cours de nos travaux nous avons utilisé la chromatographie monodimensionnelle et bidimensionnelle sur plaque de polyamide et la chromatographie sur papier Watman n°3.

CCM monodimensionnelle: cette chromatographie est développée dans une seule direction. Elle est utilisée pour l'analyse qualitative des flavones, flavonols et acides phénols des extraits éthérés de *Inula viscosa* (L.) (obtenus avec et sans hydrolyse acide) en utilisant le premier solvant de nature organique: benzène, méthanol, méthyle éthyle cétone (40/30/30).

CCM bidimensionnelle: elle est utilisée pour la séparation et l'identification des C-glycosides et hétérosides présents dans les extraits butanoliques. La plaque est placée dans le premier solvant de nature organique. La migration se fait selon le poids moléculaire de l'aglycone hétérosidique. Après séchage, la plaque est tournée de 90° et la séparation aqueuse se fait selon le nombre d'oses qui entrent dans la composition de l'hétéroside. Cette deuxième migration est réalisée dans un second solvant: méthyle éthyle cétone, eau, acétyle acétone, méthanol, n-butanol (10:45:15:5:quelques gouttes).

CP: elle est utilisée pour séparer les anthocyanes. C'est une migration descendante qui se fait par un solvant Foréstal composé par: acide acétique, eau, acide chlorhydrique concentré: (30/10/3).

Notre protocole expérimental est le suivant:

saturation des cuves: Nous avons opéré sous hotte ventilée en introduisant les phases mobiles dans deux cuves en verre hermétiquement fermées pour assurer leur saturation en vapeurs des solvants,

dépôts: L'extrait est spoté à 2 cm du bord inférieur au moyen d'un capillaire très fin (10 µl) de façon à ce qu'il soit très concentré,

développement: la plaque ou le papier à tester sont introduits verticalement dans les cuves (hermétiquement saturées en vapeur pendant 1 h) en contact avec le solvant qui va monter dans la CCM, et descendante dans la CP par capillarité en entraînant les différents solutés à des vitesses différentes (Hadj-Mahammed, 1992),

La migration ascendante dure 30 mn en moyenne, par contre la migration descendante dure 16 h. A la fin, les plaques et les feuilles sont retirées soigneusement et séchées sous hotte ventilée,

révélation: La révélation des polyphénols repose sur la coloration de leurs spots à l'examen macroscopique, à leur comportement chromatographique (Rf) et leur fluorescence en lumière UV.

* **Fluorescence :** pour les aglycones et les hétérosides elle est déterminée sous lumière UV 365 nm, pour les acides phénols sous UV à 260 nm. Par contre les anthocyanes sont visibles en lumière du jour sous forme de spots rouges (Ouafi, 1987).

D'après Markham, (1982) les hétérosides et les C- glycosides émettent des fluorescences en lumière UV (200 – 365) nm donnant ainsi:

-une fluorescence violette elle témoigne soit de l'absence d'un hydroxyle libre, soit de la présence d'un hydrogène en position 3 (flavones) et correspond ainsi aux hétérosides.

-une fluorescence bleue ou bleu verdâtre qui témoigne de la présence d'un acide phénol.

-une fluorescence jaune qui indique la présence d'un hydroxyle en position 3, et qui correspond ainsi au flavonols.

* **Rapport frontal (Rf):** le Rf est le rapport entre la distance parcourue par le soluté et la distance parcourue par le solvant.

Les Rf obtenus expérimentalement sont comparés à ceux de la bibliographie et à ceux des témoins analysés dans les mêmes conditions chromatographiques.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} = \frac{d}{D}$$

2.2.1.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P)

a. Principe

La chromatographie liquide à haute performance ou C.L.H.P est une technique très pratique et très fiable pour la séparation de très faibles quantités de produits non volatils ou thermo-dégradables (comme les polyphénols) dans les mélanges les plus complexes. Cette capacité est directement liée à la faible dimension de la colonne et à la fine granulométrie de la phase stationnaire (Hostettman et *al.*, 1998).

La séparation des composés dépend de leurs affinités pour les deux phases non miscibles: la phase stationnaire et la phase mobile liquide.

L'échantillon à analyser est déposé au sommet de la colonne. La phase mobile va faire migrer les différents constituants de l'échantillon et ceci d'autant plus rapidement que leur affinité suivant un gradient de solvant ou en régime isocratique; la phase mobile étant alors de composition constante (Lauranson, 1999).

b. Appareillage C.L.H.P

Tout composé flavonique est caractérisé par son temps de rétention. C'est le temps écoulé entre le moment de l'injection et l'apparition du maximum du pic d'élution. Ce temps de rétention n'étant parfaitement reproductible que dans des conditions expérimentales données. Il est impératif de définir le système chromatographique dans lequel nous travaillons (Kamoun, 1997).

L'appareillage de la C.L.H.P est représenté schématiquement sur la **figure 13**. Il comprend essentiellement :

- Un ou plusieurs réservoirs de la phase mobile.
- Un système de pompe.
- Un système d'introduction d'échantillon.
- Une colonne.
- Un système de détection et d'enregistrement.

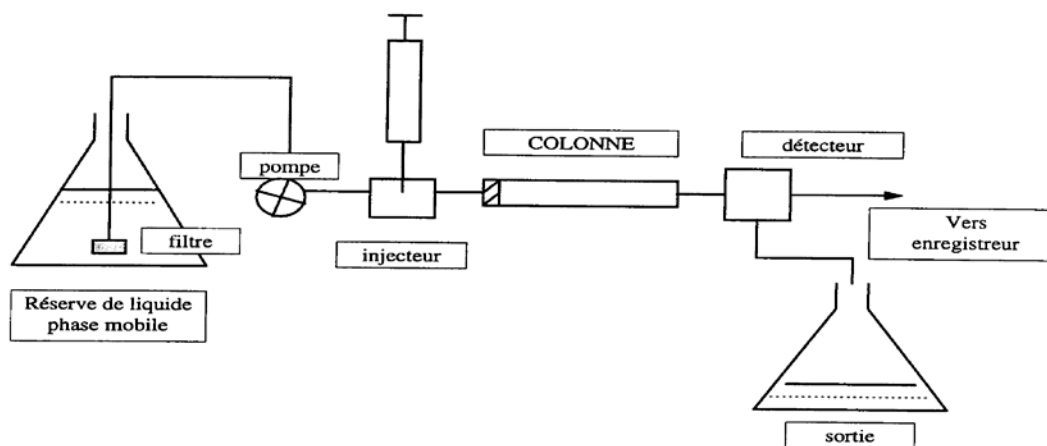


Figure 13. Schéma représentatif du principe de fonctionnement de C.L.H.P.

Réservoir de la phase mobile: contrairement à la chromatographie classique, le volume de la phase mobile nécessaire est relativement réduit.

Pompe: la pompe a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile compatible avec la séparation chromatographique.

Introduction des échantillons: les procédés utilisés dépendent des volumes de solution à chromatographier. Dans notre cas pour des quantités peu importantes, l'échantillon est introduit directement à l'aide d'une microseringue de 20 μ l.

Colonne: les colonnes utilisées en C.L.H.P se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases qu'elles contiennent. Elles sont remplies par voie humide sous pression. Pour la séparation des flavonoides, il existe deux types de phases stationnaires (colonne) généralement utilisées: la phase C18 et la C8. La première est très sélective vis-à-vis des flavonoides glycosylés en général (Ouafi, 1987) et c'est elle que nous avons retenue pour notre expérimentation (**Tableau 5**).

Tableau 5. Les conditions de C.L.H.P

Matériel	Types et caractéristiques
Colonne	C18
Diamètre	7.5 cm
Longueur	4.6 mm
Pompe : Débit	1 ml/mn
Détecteur multi-faisceaux	$260 \text{ nm} \leq \lambda \leq 380 \text{ nm}$

Système de détection et d'enregistrement: ils ont pour rôle de suivre la présence des composés dans la phase mobile au fur et à mesure de leur élution. Le type de détection sélectionné correspond au maximum d'absorption de l'extrait étheré (365 nm) particulièrement riche en flavones - flavonols (après hydrolyse acide) et même en aglycones libres (sans hydrolyse acide). Un changement de la longueur d'onde à 260 nm, nous a permis d'avoir un profil chromatographique spécifique des acides phénols.

Pour l'extrait butanolique (C- glucosides) et hydro-éthanolique (hétérosides) la détection se fait à 370 nm.

Gradient d'élution: il est possible d'augmenter graduellement la force d'élution en mélangeant deux solvants de polarités différentes (**Tableaux 6 et 7**).

- La phase mobile utilisée pour les flavones-flavonols et les aglycones libres est:
solvant A: CH₃COOH à 2% (acide acétique).

solvant B: CH₃OH pure (methanol)..

- La phase mobile utilisée pour les C-glycosides est:

solvant A: CH₃COOH à 2% (acide acétique).

solvant B: CH₃OH pure (méthanol)..

- La phase mobile utilisée pour les hétérosides:

solvant A: H₂O-C₂H₃N (Acétonitril) (98:2).

solvant B: CH₃OH-H₂O-C₂H₃N (79:19:2).

L'injection des témoins disponibles a été faite dans les mêmes conditions de détection et avec les mêmes phases mobiles appropriées. Après le choix de la phase mobile et de la phase stationnaire, nous avons mis au point un programme d'élution selon les **tableaux** suivants :

Tableau 6. Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des flavones-flavonols, aglycones libres et acides phénols.

Temps (mn)	Solvant B	Solvant A
0	5	95
30	70	30
40	70	30
44	5	95
à +44	5	95

Tableau 7. Gradient d'éluion de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des C- glycosides et des hétérosides.

Temps (mn)	Solvant B	Solvant A
0	95	5
15	17	83
25	22	78
35	37	63
45	70	30
50	12	88
à +55	12	88

2.2.2. Analyse quantitative par Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode couramment employée pour la détermination de la concentration et l'identification structurale d'un composé qu'il soit natif ou qu'il résulte d'une hydrolyse acide. Elle permet d'utiliser toute la gamme du visible et éventuellement de l'ultraviolet si l'appareil (spectrophotomètre) est équipé avec une source UV.

Ces appareils peuvent être à monofaisceau, à mono ou bicellules, mais le plus souvent ce sont des appareils à bifaisceaux avec une seule cellule qui est alternativement éclairée par l'un des deux faisceaux (Kamoun, 1997).

a. Principe

Sous le terme de colorimétrie, on regroupe aujourd'hui de façon générale les techniques de mesure physico-chimiques par des solutions colorées, utilisées pour l'évaluation quantitative de la substance dissoute.

La colorimétrie se base sur la propriété de certains composés qui absorbent davantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans le spectrophotomètre UV-visible (Plummer, 1989).

Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration (**Figure 14**), ainsi que l'étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption (Pere, 1999).

$$\text{Loi de Beer Lambert: } \text{Log} (I_0 / I) = k.e.c$$

I_0 : lumière incidente. / I : lumière émergente.

e : épaisseur de la substance colorée.

c : concentration de la substance.

k : coefficient d'extinction lié à la nature de la substance et à longueur d'onde.

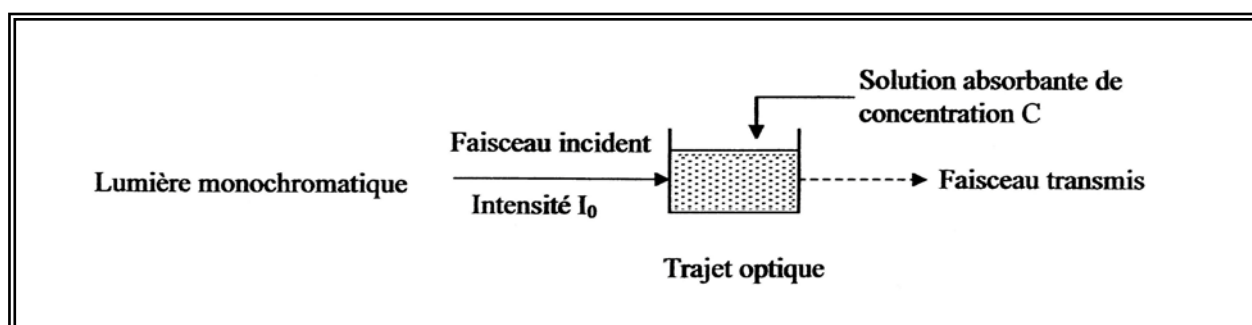


Figure 14. Schéma représentant la transmission de la lumière à travers une solution.

Le spectrophotomètre utilisé dans notre cas est le spectrophotomètre UV-visible. Ce dernier comprend deux sources S1 (lampe deutérium) et S2 (lampe tungstène halogène) et deux cuves V1 (cuve témoin) et V2 (cuve essai).

Les lectures sont faites par rapport à un témoin ne contenant que le méthanol pur.

Le protocole que nous avons suivi pour la mesure des densités optiques (DO) est décrit par (Jurd et Geissman, 1956), repris par (Mabry et *al.*, 1970).

b. Formation des complexes avec le chlorure d'aluminium

La formation par chélation de complexe entre les composés phénoliques et les métaux est largement utilisée pour la réalisation des spectres d'absorption.

Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) fait intervenir les propriétés chélatantes des ions (Al^{3+}) à l'égard des flavonoïdes. Il se forme soit des complexes labiles avec deux hydroxyles libres en position ortho, soit des complexes stables avec le carbonyle en position 4 et l'hydroxyle en position 5 et/ou en 3 (Lauranson, 1999) (**Figure 15**).

Les complexes formés ont des maximums d'absorption supérieurs de quelques dizaines de nanomètres aux maximums des flavonoïdes eux mêmes.

Le chlorure d'aluminium utilisé dans notre travail est préparé en solution méthanolique à 1%.

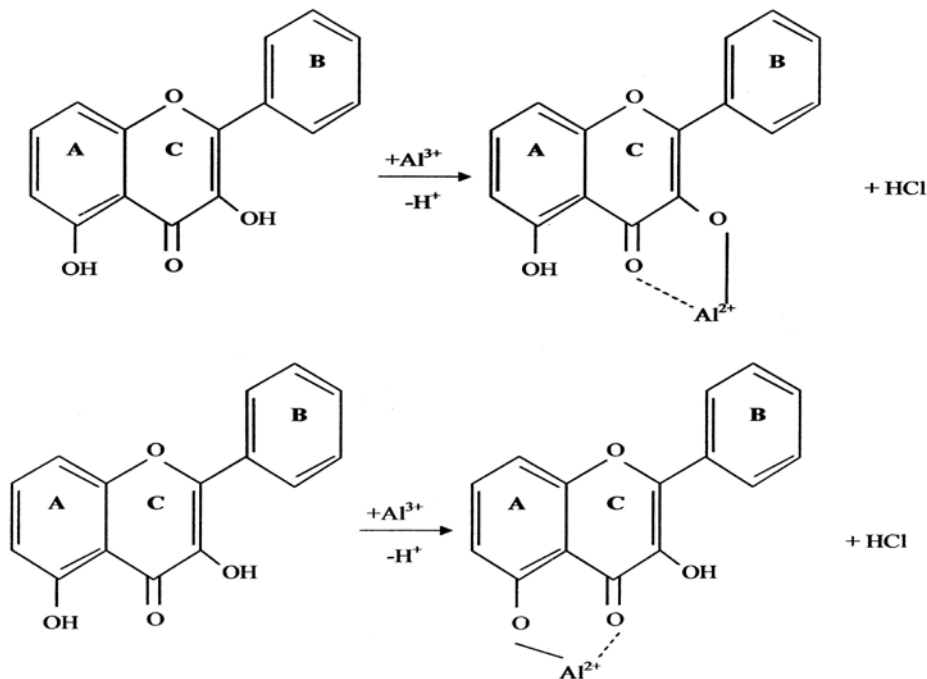


Figure 15. Réaction de chélation en position 3 et 5 des polyphénols avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃).

c. Mode opératoire

Le dosage différentiel spectrophotométrique des aglycones et des hétérosides fait intervenir les propriétés chélatantes des ions Al^{3+} sur les flavonoïdes, donc il est nécessaire de préparer pour chaque extrait à analyser deux solutions:

- une solution de référence (témoin) = X ml de méthanol + Y ml de solution à doser.
- une solution test (essai) = X ml de chlorure d'aluminium à 1% dans le méthanol + Y ml de solution à doser.

La lecture spectrophotométrique s'effectue 10 minutes après cette préparation, à la longueur d'onde d'absorption maximale située entre 380 et 460 nm.

2.2.2.1. Dosage spectrophotométrique des composés phénoliques

Nous avons dosé pour chacun des 35 individus de *Inula viscosa* (L.) quatre composés phénoliques (aglycone libre, aglycone après hydrolyse acide (flavone- flavanol), C-glycoside, hétéroside), dans les mêmes conditions expérimentales.

*** Dosage des flavones-flavonols (avant et après hydrolyse acide)**

Les deux séries de solution (témoin, essai) sont passées dans le spectrophotomètre pour lecture à 430nm.

La teneur absolue en aglycones totaux est exprimée en mg / g et elle est calculée comme pour la Quercétine par la formule suivante (Lauranson, 1999):

$$\boxed{T \text{ (mg/g)} = (\Delta DO / \epsilon) M V (d/p)} \longrightarrow \boxed{T \text{ (mg/g)} = 1,3 \cdot 10^{-2} \Delta D O \cdot V \cdot d / p}$$

ΔDO : Densité optique du pic différentiel.

M: Masse molaire de la quercétine (M = 302).

V: Volume de la solution méthanolique d'aglycones flavoniques (ml).

d: Facteur de dilution.

ϵ : Coefficient d'absorption molaire de la quercétine dans le chlorure d'aluminium (=230 000).

p: Poids du matériel végétal sec hydrolysé en gramme.

*** Dosage des C- glycosides**

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotomètre UV-visible à 340nm. La teneur des C-glycosides est exprimée en Orientine et elle est calculée par la formule suivante (Lauranson, 1999).

$$\boxed{T \text{ (mg/g)} = DO/\epsilon \cdot M \cdot V \cdot d/p} \longrightarrow \boxed{T \text{ (mg/g)} = 2.5 \cdot 10^{-2} \cdot DO \cdot V \cdot d / p}$$

DO: densité optique.

p: poids sec du matériel végétal hydrolysé en gramme.

ϵ : coefficient d'absorption molaire de l'orientine (= 18850).

M: masse molaire de l'orientine (= 448).

V: volume de la phase méthanolique contenant les C-glycosides (ml).

d: facteur de dilution.

*** Dosage des hétérosides**

Leur lecture spectrophotométrique s'effectue à 430 nm, parallèlement à une courbe établie à partir d'une solution mère de rutine dans le méthanol à 8‰ (**Figure 16**). L'extrapolation des

densités optiques différentielles sur la courbe étalon permet de connaître les teneurs absolues en mg/g de Rutine (Ouafi, 2007).

Les résultats des mesures des densités optiques ont été regroupés dans le **tableau** suivant:

Tableau 8. Densités optiques en fonction des différentes concentrations de la rutine

Dilution	0	2	4	6	8	10	12
Concentration (mg/1000ml)	8‰	4‰	2‰	1.3‰	1‰	0.8‰	0.6‰
Densité optique (DO)	0.54	0.28	0.135	0.09	0.06	0.051	0.031

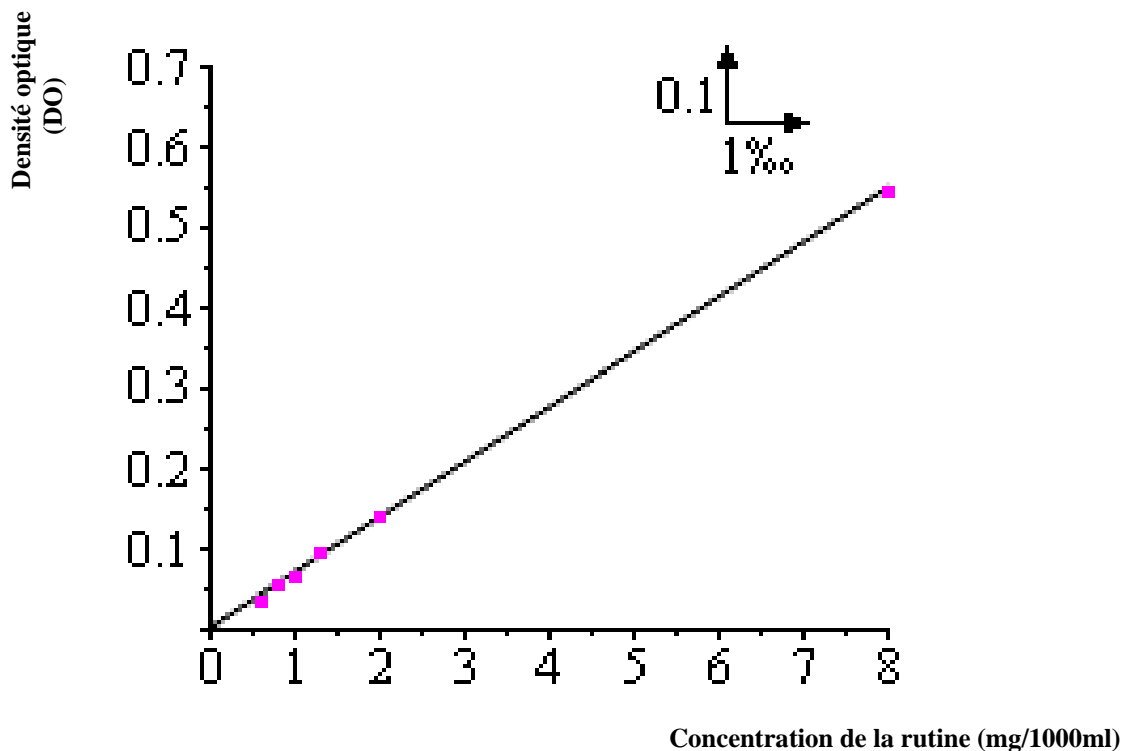


Figure16. Courbe d'étalonnage des hétérosides flavoniques obtenue à partir d'une solution mère de rutine à 8‰

2.2.2.2. Analyse statistique des données

Les teneurs absolues déterminées par le dosage spectrophotométrique sont traitées pour une évaluation de la diversité intra spécifique de *Inula viscosa* (L.) par rapport aux 4 variables phénoliques. La mise en œuvre de ce traitement s'est faite à partir des logiciels Winstat et Statistica, dont l'ACP qui revient à comparer les variables entre elles (Legendre et Legendre, 1994). En effet, nous avons pratiqué une ACP pour les données brutes à partir d'une matrice de corrélation (les écarts-types relatifs aux variables étant hétérogènes).

Par la suite, nous avons projeté le nuages des individus (observations) dans l'espace des variables. Enfin, une CAH a été faite dans un but de compléter les informations données par l'ACP.

2.3. Tests microbiologiques

Le but de ces tests est de mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne (bactéries Gram+ et Gram-) et antifongique (levures et moisissure phytopathogène) des composés phénoliques extraits des feuilles de *Inula viscosa* (L.).

Il existe cinq extraits à tester; quatre parmi eux sont des extraits polyphénoliques de la plante (extrait des aglycones libres, des flavones-flavanols, des C-glycosides et des hétérosides.). Le cinquième est un extrait aqueux brut qui serre de témoin.

2.3.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne et antifongique (levures)

C'est une méthode dont le principe est tiré de la pharmacopée européenne et qui a été validée au niveau du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL pour étudier la résistance des souches bactériennes et des levures.

2.3.1.1. Principe

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes dont la concentration est de 10^6 - 10^7 germes. mL⁻¹ (Cavallo, 2006) mis au contact des polyphénols de *Inula viscosa* (L.), et ceci par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques absorbants stériles.

Les disques absorbants de 9 mm de diamètre sont imprégnés d'une quantité des différents extraits et déposés sur une gélose inoculée par les souches testées. La diffusion de ces extraits au sein de la gélose permet d'observer après incubation, en cas d'action bactéricide ou fongicide, une zone claire autour du disque appelée zone d'inhibition.

2.3.1.2. Protocole expérimental

Cette technique est basée sur l'utilisation de deux couches de gélose dont l'une est inoculée avec le germe testé.

*** Préparation de la première couche de milieu**

Les milieux de culture, MH pour les bactéries et SAB pour les levures, sont fondus dans un bain-marie à 95°C. les milieux gélosés fondus sont ensuite coulés aseptiquement dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (15- 20 ml / boîte) avec 3 répétitions par souche. La gélose est mise à refroidir et à solidifier.

***Préparation de l'inoculum**

A partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures, des suspensions troubles sont réalisées en prélevant avec une pipette pasteur 3 à 5 colonies bien

isolées et identiques qu'on déposera dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. Après homogénéisation de la suspension microbienne, une 1^{ère} lecture de la densité optique est notée avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm et qui doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries et entre 2 à 3 pour les levures. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 germes. mL⁻¹ (d'après les études faites au laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL).

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

***Préparation de la deuxième couche de milieu**

Les milieux de culture MH et SAB sont fondus et refroidie à 45°C. Nous avons par la suite rempli des flacons stériles avec 50 ml par les milieux préalablement fondus, à l'aide d'une micropipette on ensemence 200 µl de chaque suspension microbienne et on agite les flacons. Nous déposons rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose solidifiée. En faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier.

***Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, nous prenons un disque stérile dont nous imbibons l'extrémité par l'extrait à tester qui sera absorbé progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque. Ce dernier est déposé sur la surface de la gélose. Nous laissons diffuser 30 mn. Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour les levures.

***Lecture**

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'extrait à tester. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition (l'échelle de performance de Chifundera). Les souches sont considérées comme résistantes, peu sensibles, sensibles, très sensibles quand les diamètres de la zone d'inhibition sont respectivement de:

$D < 9 \text{ mm} / 10 \text{ mm} \geq D \leq 16 \text{ mm} / 16 \text{ mm} \geq D \leq 22 \text{ mm} / D > 22 \text{ mm}$ (Chifundera, 1990).

Nous signalons que les différentes étapes ont été effectuées dans des conditions de stérilité rigoureuses:

- Les différents extraits ont été conservés au congélateur.
- Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte ventilée pour éviter la contamination des milieux ou du matériel.

2.3.2. Evaluation de l'activité antifongique (moisissure phytophagène)

La détermination du pouvoir antifongique est évaluée par la technique de contact direct, décrite par Chang et *al.* (1999; 2000). Les quantités d'extraits polyphénoliques de *Inula viscosa* (L.) sont de 1 ml chacune. Elles sont additionnées à 10 ml de PDA stérile et fondu. Les mélanges sont coulés dans des boîtes de Petri et solidifiés. Des disques de mycélium de 5 mm de diamètre sont coupés de la périphérie d'une culture de 7 jours et inoculés au centre des boîtes qui seront par la suite incubées à 25 °C ± 2.

La lecture est suivie jusqu'au huitième jour. La mesure des diamètres de croissance du mycélium par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule suivante :

$$\text{Indice antifongique (IA)} = (1 - (\text{Da}/\text{Db})) * 100$$

Da: diamètre de croissance des mycéliums dans les boîtes traitées (mm);

Db: diamètre de croissance des mycéliums dans les boîtes non traitées (témoin) (mm).

2.4. Etude pharmacologique

La réalisation de cette étude a été faite au laboratoire de pharmacologie du C.R.D. Elle nous a permis de tester deux activités cicatrisantes de la plante : une cicatrisation cutanée et une autre de la paroi stomacale.

2.4.1. Evaluation de l'effet cicatrisant de la poudre végétale de *Inula viscosa* (L.) par le modèle excisionnel chez la souris

2.4.1.1. Objectif

L'évaluation de l'effet d'un cicatrisant dans le processus de réparation naturel, est réalisée par la méthode d'excision profonde et circulaire où la totalité de l'épaisseur cutanée peut être extraite grâce à une biopsie.

Cette méthode présente l'avantage d'une meilleure précision de mesure du fait de la continuité du processus de reconstitution jusqu'au stade de fermeture totale de la plaie, et de plus elle est adaptée aux analyses histologiques (Meaume et Dereure, 2001).

2.4.1.2. Principe

Il consiste en l'application du produit à tester sur des plaies préalablement provoquées. Les applications se font de façon quotidienne jusqu'à épithélialisation complète de la plaie (14 à 15 jours). Cette étude permet de comparer les différentes cicatrices et leur évolution en se basant sur la modification de leurs surfaces et ce chez chacun des individus.

2.4.1.3. Protocole expérimental

L'étude a porté sur trois lots de dix souris chacun. Le premier (SE) est traité avec la pommade à tester (50 g de la poudre de *Inula viscosa* (L.) + 100 g de Vaseline). Le second ne recevra aucun traitement et servira de témoin négatif (ST-). Le troisième lot recevra le Banéocin et représentera le témoin positif (ST+).

Les souris sont numérotées et mises à jeun la veille de l'expérimentation. Celle-ci comporte les étapes suivantes (**Figure 17**):

- anesthésie des souris en injectant la Kétamine par voie intra péritonéale (VIP) (membrane qui recouvre les organes de la cavité abdominale) à la dose 100 mg/kg,
- épilation à la main les souris au niveau de la région dorsale jusqu'à l'apparition nette de la peau,
- désinfection de la région épilée avec de l'alcool chirurgical à 70 %,
- marquage des zones à découper à l'aide d'un cylindre de forme arrondie de 1 cm² de surface,
- découpage de la zone tracée en utilisant une paire de ciseaux et une pince et enlever la peau de cette zone (ablation de la peau par excision),
- nettoyage des surfaces dépourvue de peau par de la gaze imbibée d'eau physiologique à 0.9 %,
- prise des empreintes des surfaces de chaque souris sur papier transparent à J0.
- application sur le lot (SE) du produit à tester à raison de 200 mg par site et sur le lot (ST+) le produit de référence à la même dose.

Les applications se feront d'une façon quotidienne jusqu'au stade de fermeture totale de la plaie.

Au cours de cette expérimentation, les empreintes des plaies sont prélevées sur une feuille transparente dès le jour J0, J4, J7, J9, J11 et J14. Les résultats des diamètres des surfaces sont calculés à l'aide d'un AUTOCAD d'architecte.

Les pourcentages de réduction (PR) des surfaces des plaies traitées a été calculé selon la loi suivante :

$$\text{PR} = (\text{MJ0} - \text{MJn}) / \text{MJ0} \quad \times 100$$

SE : lot de souris essai. ; **ST-** : lot de souris témoin non traité. ; **ST+** : lot de souris témoin traités au Banéocin.;
MJ0: moyenne de surface des plaies calculées à J0; **MJn**: moyenne de surface des plaies calculées à J n.



1



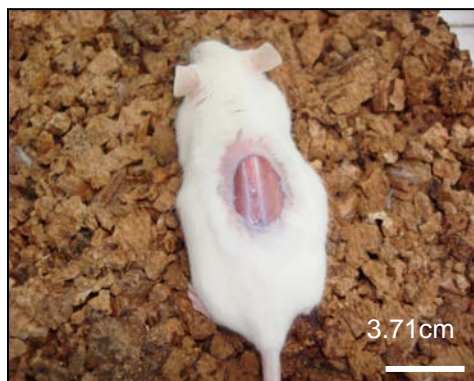
2



3



4



5



6

1. Anesthésie les souris par VIP.
2. Epilation la région dorsale.
3. Marquage la zone à découper.
4. Souris en incision chirurgicale.
5. Souris après incision chirurgicale.
6. Application de la pommade à tester.

Figure 17. Les étapes du modèle excisionnel (protocoles expérimentaux internes du C.R.D).

Dans une dernière étape une étude histologique est effectuée dans un but comparatif après avoir sacrifié les animaux des lots (ST+) et (SE) en dernier stade (14 jours). Par la suite, des excisions des plaies cicatrisées sont réalisées et les fragments sont fixés dans le FAA (formaldehyde/ acide acétique/ alcool éthylique). Les autres étapes d'obtention de coupes histologiques sont réalisées selon la technique classique de Gabe (1968) (**Annexe 3**).

Analyse statistique des résultats

La comparaison des valeurs moyennes des résultats a été faite à l'aide du test de Student. Les différences sont considérées statistiquement significatives lorsque la valeur de la probabilité égale à 5 %.

2.4.2. Activité antiulcère gastroduodéal de *Inula viscosa* (L.)

2.4.2.1. Principe et objectif

Pour l'étude de l'activité antiulcère de *Inula viscosa* (L.), nous avons administré par voie orale les produits à tester à des rats chez lesquels l'ulcère expérimental a été induit par un anti-inflammatoire.

Le but de cette manipulation est de déterminer l'effet et le taux d'efficacité de l'extrait flavonique et du décocté de *Inula viscosa* (L.) par rapport à un médicament antiulcère de référence: la Ranitidine.

2.4.2.2. Produits administrés à tester

a. Préparation de la décoction aqueuse (à 10 %)

Dans un bécher, 100 g de poudre végétale sont additionnés à 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition sur une plaque chauffante pendant 15 mn, c'est la décoction. Cette dernière est suivie par une macération pendant 48 h. A l'aide d'un papier filtre, la suspension obtenue est filtrée et récupérée. Le résidu sec resté sur le papier est récupéré en raclant légèrement et soigneusement à l'aide d'une lame. Il sera additionné au filtrat obtenu. Après évaporation au rotavapeur, le résidu sec est pesé (25 g) puis récupéré dans 40 ml d'eau distillée. Cette préparation est la solution mère à partir de laquelle sont préparées deux doses de décocté : une à 250 mg/kg/j et une autre à 500 mg/kg/j (**Figure18, annexe 4**).

b. Extrait flavonique de *Inula viscosa* (L.) (Voir chapitre des extractions " extrait hydro-éthanolique").

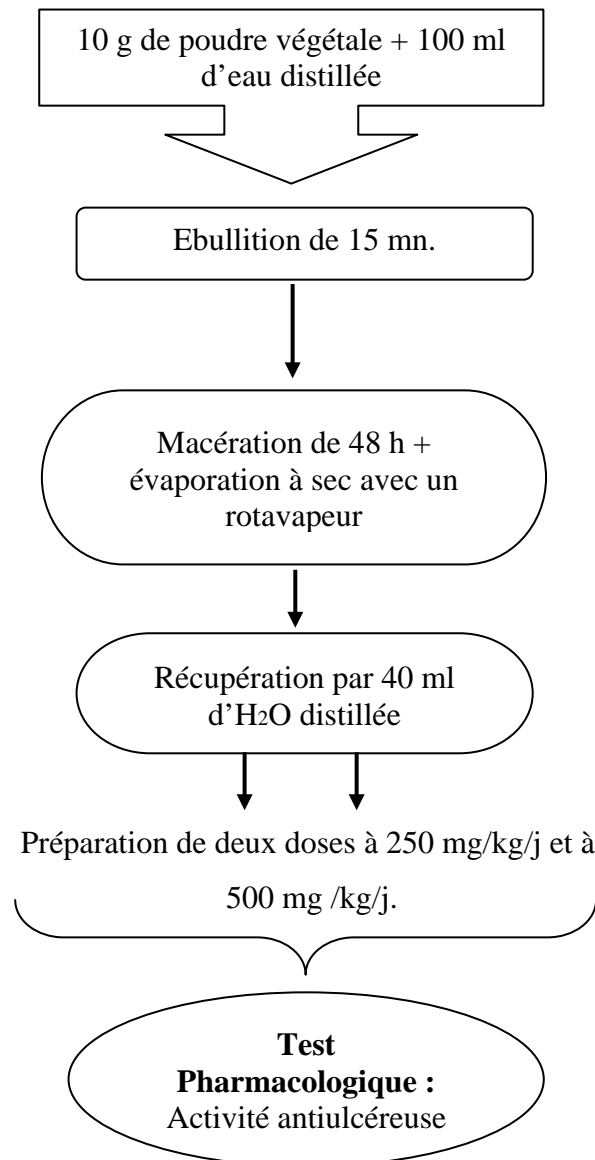


Figure18. Protocole expérimental de décoction.

2.4.2.3. Protocole expérimental

Les méthodes d'étude de l'activité antiulcéreuse sont précédées par un test ulcéreux. Pour cela, les techniques expérimentales se déroulent en deux étapes:

1^{ère} étape : Test ulcéreux

Le principe consiste en une administration orale de la Phénylbutazone (PBZ) à 2 ml (200 mg/kg/j) durant 4 jours consécutifs aux rats soumis à la diète sans être privés d'eau ce qui provoque un ulcère. Les rats sont sacrifiés par la suite pour une étude macroscopique et un prélèvement d'estomac afin d'évaluer le nombre d'ulcérations selon la cotation de Lowff résumée dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Cotation des ulcères.

Observation	Pas d'ulcère	1 à 2 ulcères	3 à 4 ulcères	Plus de 4 ulcères
Score	0	1	2	3

D'après les résultats des cotations l'indice d'ulcération est calculé selon la formule suivante:

$$I.U = \frac{\text{Somme des cotations} \cdot \% \text{ d'estomac présentant des ulcères}}{\text{Nombre d'animaux}}$$

2^{ème} étape : Test antiulcéreux

Il consiste en une administration orale de 2 ml de l'extrait flavonique et de la décoction à 10% de *Inula viscosa* (L.) en utilisant 2 doses : 250 mg/kg/j et 500 mg/kg/j, ainsi qu'un produit de référence Ranitidine à une dose de 5 mg/kg/j, pendant 14 jours consécutifs aux rats atteints d'ulcère gastrique suite à la prise de la PBZ, et cela à partir du 5^{ème} jours.

Après 6 h de la dernière administration qui correspond au 14^{ème} jour de traitement, les rats seront sacrifiés et les estomacs prélevés et observés.

Administration des produits et répartition des animaux

Afin de réaliser ce test, nous avons utilisé 42 rats mis à la diète sans être privés d'eau 16 h avant la 1^{ère} administration, ils sont maintenus jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les animaux sont répartis en 6 lots de 7 rats chacun comme suit :

- lot témoin I : il reçoit par voie orale de la phénylbutazone (PBZ) durant 4 jours, 6 h après la dernière administration. Les rats de ce lot seront sacrifiés pour s'assurer de la présence d'ulcère.
- lot témoin II : reçoit par voie orale de la phénylbutazone (PBZ) durant 4 jours suivie d'une administration d'eau distillée pendant 14 jours.
- lot essai I : reçoit par voie orale de la PBZ durant 4 jours suivie d'une administration orale de l'extrait flavonique de *Inula viscosa* (L.) pendant 14 jours.
- lot essai II : reçoit par voie orale de la PBZ durant 4 jours suivie d'une administration orale de l'extrait aqueux de *Inula viscosa* (L.) à une dose de 250 mg/kg/j pendant 14 jours.

- lot essai III : reçoit par voie orale de la PBZ durant 4 jours suivie d'une administration orale de l'extrait aqueux de *Inula viscosa* (L.) à une dose de 500 mg/kg/j pendant 14 jours.
- Lot de référence : reçoit par voie orale de la PBZ durant 4 jours suivie d'une administration orale de la Ranitidine à 5 mg/kg/j durant 14 jours.

Analyse statistique des résultats

Le taux d'ulcération d'estomacs est calculé en termes de moyenne des quatre déterminations (colonnes) portant chacune sur 7 individus. L'analyse statistique des moyennes est réalisée à l'aide du test de l'analyse de la variance "ANOVA à un facteur". Les moyennes de l'ulcération ont été traitées et comparées par le test de Fisher au seuil de 5%.

Résultats et Discussions

1. Etude biochimique des composés phénoliques de *Inula viscosa* (L.)

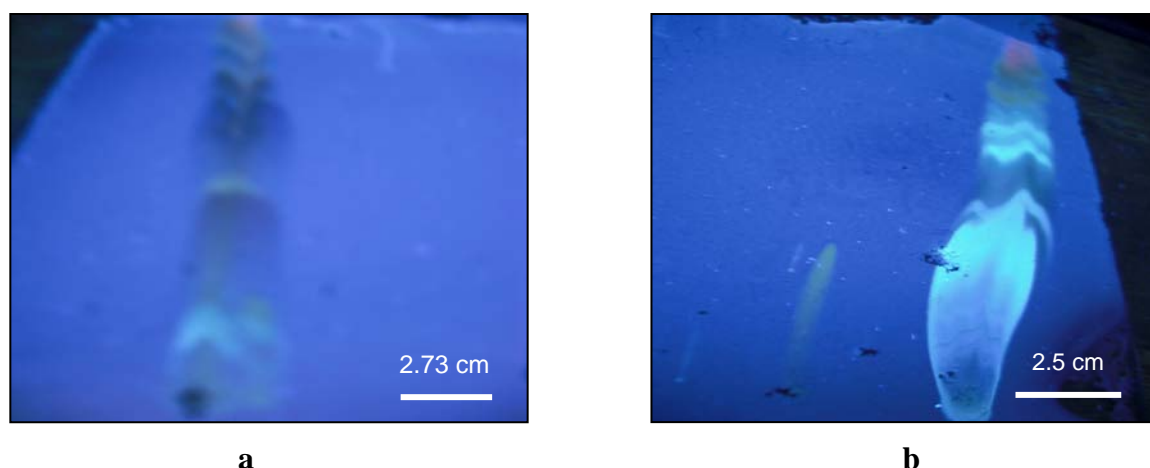
L'étude biochimique est réalisée à travers une analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques de *Inula viscosa* (L.) par différentes techniques chromatographiques et spectrophotométriques.

1.1. Analyse qualitative des composés phénoliques par C.C.M et C.P

1.1.1. Identification des aglycones flavoniques par chromatographie sur couche mince (C.C.M) monodimensionnelle

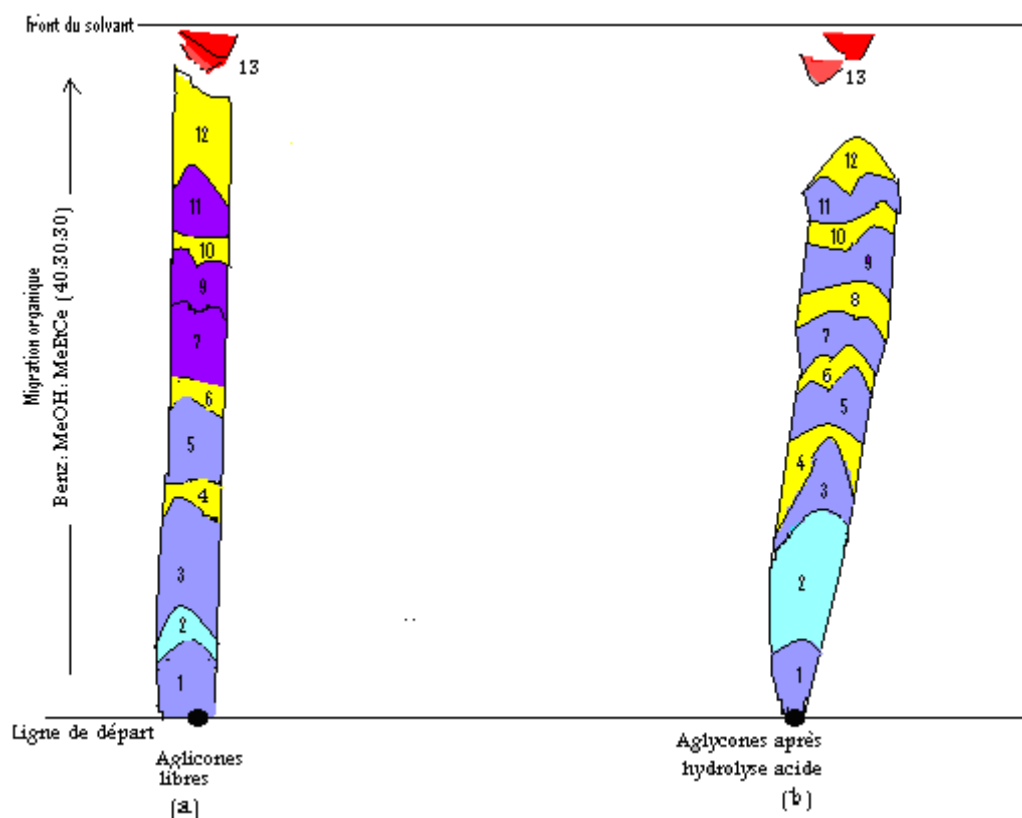
La révélation du chromatogramme des flavones-flavonols libres et glycosilés (**Figures 19a et 19b**) sous UV à 365 nm montre la présence de taches de fluorescences différentes à des distances variables (Rf).

Nous avons reproduit les chromatogrammes monodimensionnels des aglycones à partir d'un calque de plaques (**Figures 19a et 19b**) afin de mieux observer le sens et le niveau de migration des composés (**Figure 20**).



Figures 19a et b. Photos des plaques chromatographiques des aglycones flavoniques obtenus par C.C.M monodimensionnelle sur gel de polyamide.

- a. Aglycones flavoniques obtenus avant hydrolyse acide (Aglycones libres).
- b. Aglycones flavoniques obtenus après hydrolyse acide, en présence de produits de référence.



1- Lutéoline, 2- Acide caféique, 3- Taxifoline, 4- Quercétine, 5- Apigénine, 6- Kaempférol, 7- Chrysoeriol, 8- Isorhamnétine, 9- Tricine, 10- Rhamnocitrine, 11- Naringénine, 12- Rhamnétine, 13- Chlorophylle a+b.

Figure 20. Schéma du chromatogramme monodimensionnel des aglycones flavoniques obtenus sans hydrolyse acide (a) et après hydrolyse acide (b).

Ces taches sont identifiées par comparaison des Rf et des fluorescence sous UV à ceux des témoins utilisés dans les mêmes conditions expérimentales (Quercétine, Isorhamnétine, Kaempférol) et à ceux de la bibliographie (Lebreton, 1967; Ouafi, 1987 et 2007). Les résultats sont regroupés dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait éthéré (avant et après hydrolyse acide) de *Inula viscosa* (L.) identifiés par CCM monodimensionnelle.

Tache	Fluorescence UV	Rf	Composé correspondant
1	Violette	0.10	Lutéoline
2	Bleue claire	0.12	Acide caféique
3	Violette	0.35	Taxifoline
4	Jaune	0.40	Quercétine
5	Violette	0.51	Apigénine
6	Jaune	0.54	Kaempférol
7	Violette	0.59	Chrysoeriol
8	Jaune	0.63	Isorhamnétine
9	Violette	0.71	Tricine
10	Jaune	0.75	Rhamnocitrine
11	Violette	0.79	Naringénine
12	Jaune	0.84	Rhamnétine
13	Rouge	0.89	Chlorophylle a+b

Rf: migration organique (Benz/Me OH/ Me Et Ce 40:30:30).

Les fractions chimiques obtenues ont été regroupées en :

Flavones: Lutéoline, Chrysoeriol, Tricine, Naringénine et Apigénine.

Flavonols: Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnocitrine, Rhamnétine et Kaempférol.

Flavanonol: Taxifoline.

Acide phénol (Série cinnamique): Acide caféique.

Nous constatons que les mêmes aglycones flavoniques sont présents dans les deux extraits sans hydrolyse et après hydrolyse acide à l'exception d'un flavonol: la Isorhamnétine qui n'est présente que sous forme hétérosidique (obtenue après hydrolyse acide).

1.1.2. Identification des C-glycosides par C.C.M bidimensionnelle

L'étude qualitative des C-glycosides se fait par fractionnement de la phase butanolique sur C.C.M de polyamide grâce à la migration ascendante de deux solvants. Un premier solvant organique qui fait migrer les substances selon le squelette flavonique et un deuxième solvant aqueux qui fait migrer les substances selon le nombre de sucres greffés sur le squelette flavonique.

L'observation du chromatogramme sous lampe UV à 365 nm a révélé la présence de plusieurs taches (**Figures 21 et 22**). Par comparaison avec la bibliographie et les témoins réalisée dans les mêmes conditions (Vitexine, Orientine) (Lebreton, 1967; Ouafi, 1987), nous avons pu identifier ces dernières. Les résultats sont regroupés dans le **tableau 11**.

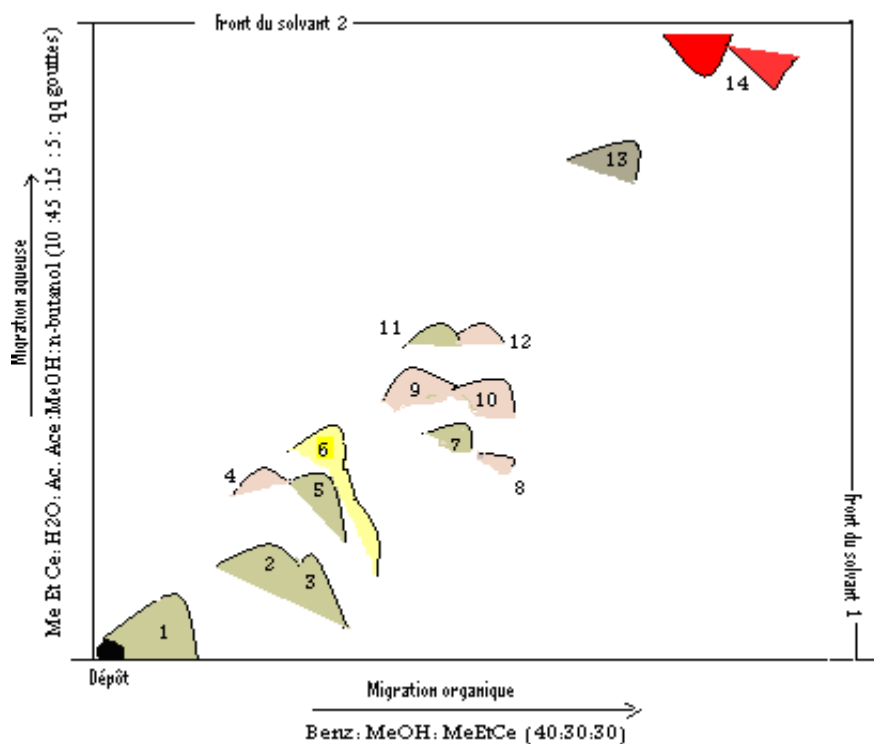
Tableau 11. Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait butanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par CCM bidimensionnelle sur gel de polyamide.

Tache	Fluorescence UV	Rf		Composé correspondant
		Rf 1	Rf 2	
1	Brune foncée	0.12	0.14	Glycoside acylé
2	Brune foncée	0.21	0.22	Mono-C-Tricine
3	Brune foncée	0.17	0.33	Mono-C-Lutéoline (Orientine)
4	Brune claire	0.33	0.20	Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine)
5	Brune foncée	0.32	0.29	Mono-C-Apigénine (Vitexine)
6	Jaune	0.4	0.35	Quercétine
7	Brune foncée	0.37	0.46	Di-C-Lutéoline
8	Brune claire	0.32	0.52	Di-C-Apigénine
9	Brune claire	0.46	0.43	Di-C-Apigénine (iso)
10	Brune claire	0.43	0.52	Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine)
11	Brune claire	0.59	0.43	Mono-C-Quercétine
12	Brune claire	0.57	0.52	Mono-C-Kaempférol
13	Brune foncée	0.8	0.63	Di-C-Tricine
14	Rouge	0.86	0.65	Chlorophylle a+b

Rf₁ : rapport frontal de la migration organique (Benz/Me OH/ Me Et Ce 40:30:30).. Rf₂ : rapport frontal de la migration aqueuse (Me Et Ce/ H₂O /Ac.Ace/ Me OH/n-Butanol 10:45:15:5:qq gouttes)



Figure 21. Photo de la plaque chromatographique des C-glycosides obtenus par C.C.M bidimensionnelle sur gel de polyamide.



1- Glycoside acylé, 2- Mono-C-Tricine, 3- Mono-C-Lutéoline (Orientine), 4- Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine), 5- Mono-C-Apigénine (Vitexine), 6- Quercétine, 7- Di-C-Lutéoline, 8- Di-C-Apigénine, 9- Di-C-Apigénine(iso), 10- Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine), 11- Mono-C-Quercétine, 12- Mono-C-Kaempférol, 13- Di-C-Tricine, 14- Chlorophylle a+b.

Figure 22. Schéma du chromatogramme bidimensionnel des C-glycosides flavoniques.

1.1.3. Identification des hétérosides (C-glycosides et O-glycosides) par C.C.M bidimensionnelle

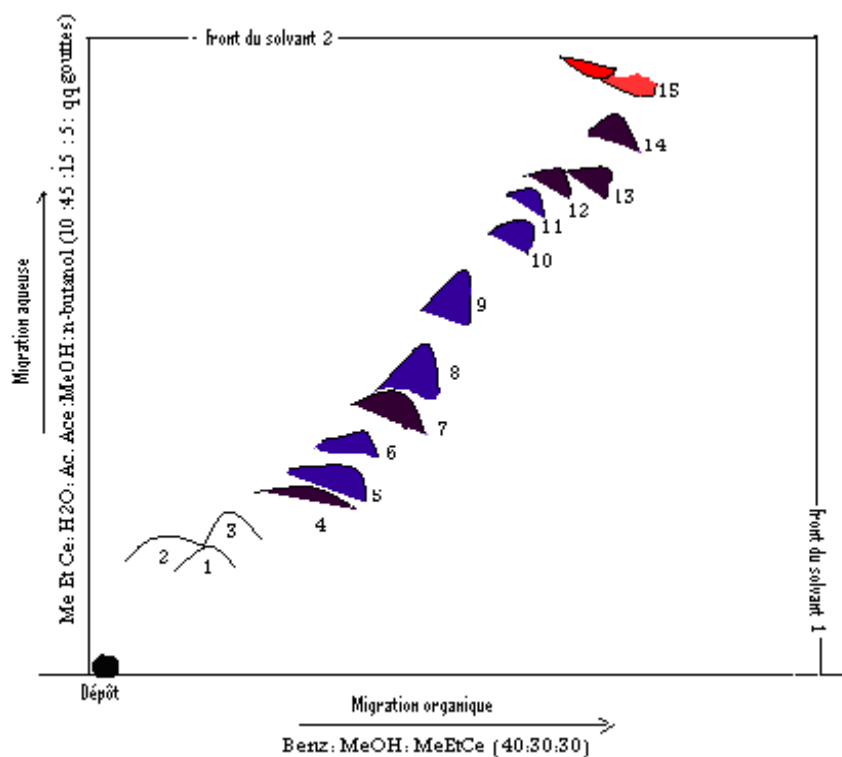
L'analyse qualitative de l'extrait hydroalcoolique pour l'identification des hétérosides se fait dans le même système de solvants que celui des C-glycosides.

La révélation des plaques chromatographiques sous UV à 365 nm montre la présence de taches de fluorescence différentes (**Figure 23**). Nous avons pu identifier les principaux composés en comparant les valeurs des Rf calculés à ceux trouvés dans la littérature et à ceux des témoins réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (Vitexine, Orientine, Rutine).

Les résultats sont regroupés dans le **tableau 12** et illustrés par la **figure 24**.



Figure 23. Photo de la plaque chromatographique des hétérosides flavoniques obtenus par C.C.M bidimensionnelle sur gel de polyamide.



1, 2, 3- Glycosides acylés, 4- Rhamnoglucoside 3 Quercétine (Rutine), 5- Mono-C-Tricine, 6- Mono-C-Lutéoline (Orientine), 7- Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine), 8- Galactoside 3 Isorhamnétine, 9- Galactoside 3 Quercétine, 10- Rhamnoside 7 Chysoeriol, 11- Rhamnoglycoside 7 Tricine, 12- Glucose de Chysoeriol, 13- Glucoside 7 Tricine, 14- Di-C-Tricine, 15- Chlorophylle a+ b.

Figure 24. Schéma du chromatogramme bidimensionnel des hétérosides flavoniques.

Tableau 12. Caractéristiques chromatographiques des composés de l'extrait hydroalcoolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par CCM bidimensionnelle sur gel de polyamide.

Tache	Fluorescence UV	Rf		Composé correspondant
		Rf ₁	Rf ₂	
1	blanche	0.18	0.14	Glycoside acylé
2	blanche	0.12	0.20	Glycoside acylé
3	blanche	0.19	0.21	Glycoside acylé
4	Violette foncée	0.27	0.46	Rhamnoglucoside 3 Quercétine (Rutine)
5	Violette claire	0.31	0.49	Mono-C-Tricine
6	Violette claire	0.36	0.51	Mono-C-Lutéoline (Orientine)
7	Violette foncée	0.42	0.55	Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine)
8	Violette claire	0.51	0.58	Galactoside 3 Isorhamnétine
9	Violette claire	0.63	0.67	Galactoside 3 Quercétine
10	Violette claire	0.71	0.75	Rhamnoside 7 Chrysoeriol
11	Violette claire	0.76	0.75	Rhamnoglucoside 7 Tricine
12	Violette foncée	0.79	0.8	Glucoside de Chrysoeriol
13	Violette foncée	0.79	0.87	Glucoside 7 Tricine
14	Violette foncée	0.89	0.88	Di-C-Tricine
15	Rouge	0.95	0.89	Chlorophylle a+b

Rf₁ : rapport frontal de la migration organique (Benz/Me OH/ Me Et Ce 40:30:30).. Rf₂ : rapport frontal de la migration aqueuse (Me Et Ce/ H₂O /Ac.Ace/ Me OH/n-Butanol 10:45:15:5:qq gouttes)

Discussion: Le chromatogramme des hétérosides flavoniques de *Inula viscosa* (L.) a montré la présence de 14 hétérosides dont 11 sont des hétérosides flavoniques :

4 C-glycosides: Mono-C-Tricine, Mono-C-Lutéoline (Orientine), Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine) et Di-C-Tricine.

7 O-glycosides: Rhamnoglucoside 3 Quercétine (Rutine), Galactoside 3 Isorhamnétine, Galactoside 3 Quercétine, Rhamnoside 7 Chrysoeriol, Rhamnoglucoside 7 Tricine, Glucoside de Chrysoeriol et Glucoside 7 Tricine.

Les 3 premiers composés hétérosidiques sont des glycosides acylés.

Par comparaison avec le chromatogramme des C-glycosides flavoniques en plus des 4 C-glycosides initialement révélés, nous avons trouvé 7 autres molécules.

1.1.4. Identification des anthocyanes par chromatographie descendante sur papier Whatman (CP)

Le fractionnement de l'extrait butanolique de *Inula viscosa* (L.) sur papier Whatman n°3 en présence du solvant Forestal et la révélation des chromatogrammes à la lumière du jour ne fait apparaître aucune tache significative.

Ces résultats ont permis de dire que notre plante est pauvre ou dépourvue d'anthocyanes.

1.2. Analyse qualitative des composés phénoliques par C.L.H.P

1.2.1. Identification des flavones-flavonols et des acides phénols par la C.L.H.P

Le passage en C.L.H.P de l'extrait contenant les aglycones flavoniques (après hydrolyse acide) à 365 nm dans le mode gradient d'élution nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la figure 25.

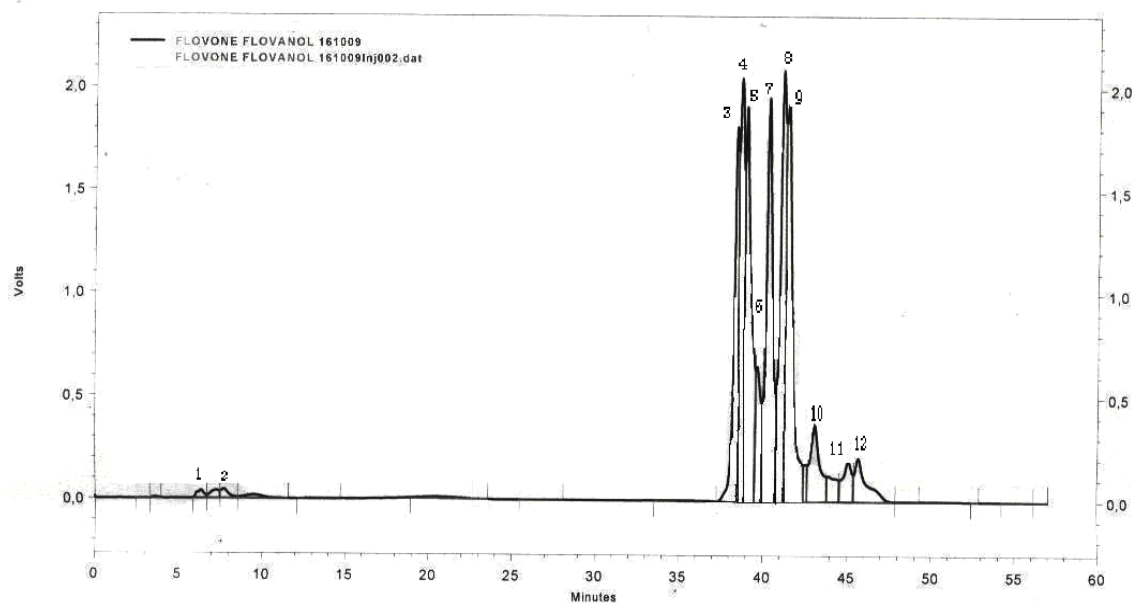


Figure 25. Profil chromatographique représentant les flavones-flavonols, détectés par C.L.H.P à 365 nm en mode gradient d'élution.

Le profil fait apparaître des pics correspondants à 12 composés flavoniques, dont les caractéristiques chromatographiques sont regroupées dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractéristiques chromatographiques des flavones-flavonols contenus dans l'extrait éthéré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 365 nm.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Teneur relative (%)
1	6.358	Taxifoline	0.23
2	7.717	Taxifoline 7 méthyl	0.35
3	38.383	Lutéoline	13.34
4	38.633	Quercétine	15.25
5	38.950	Kaempférol	14.06
6	39.60	Isorhamnétine	4.76
7	40.283	Chrysoeriol	14.3
8	41.108	Tricine	15.49
9	41.425	Rhamnétine	16.68
10	43.075	Apigénine	2.74
11	45.100	Naringénine	1.31
12	45.692	Rhamnocitrine	1.43

La comparaison des temps de rétention avec ceux de la bibliographie (Ouafi, 2007) permet l'identification de 12 composés flavoniques :

5 Flavones: Lutéoline, Chrysoeriol, Tricine, Naringénine et Apigénine.

5 Flavonols: Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnocitrine, Rhamnétine et Kaempférol.

2 Flavanonols: Taxifoline, Taxifoline 7 méthyl.

La comparaison de la somme des teneurs relatives des flavones avec celle des flavonols, nous indique qu'il existe une parité dans leur distribution au sein de la plante sous forme de O-glycosides (52.18 % contre 47.18 %).

Le changement de la longueur d'onde de 365 nm à 260 nm (longueur d'onde caractéristique des acides phénols) nous a permis d'avoir un nouveau profil chromatographique pour le même extrait (**Figure 26**).

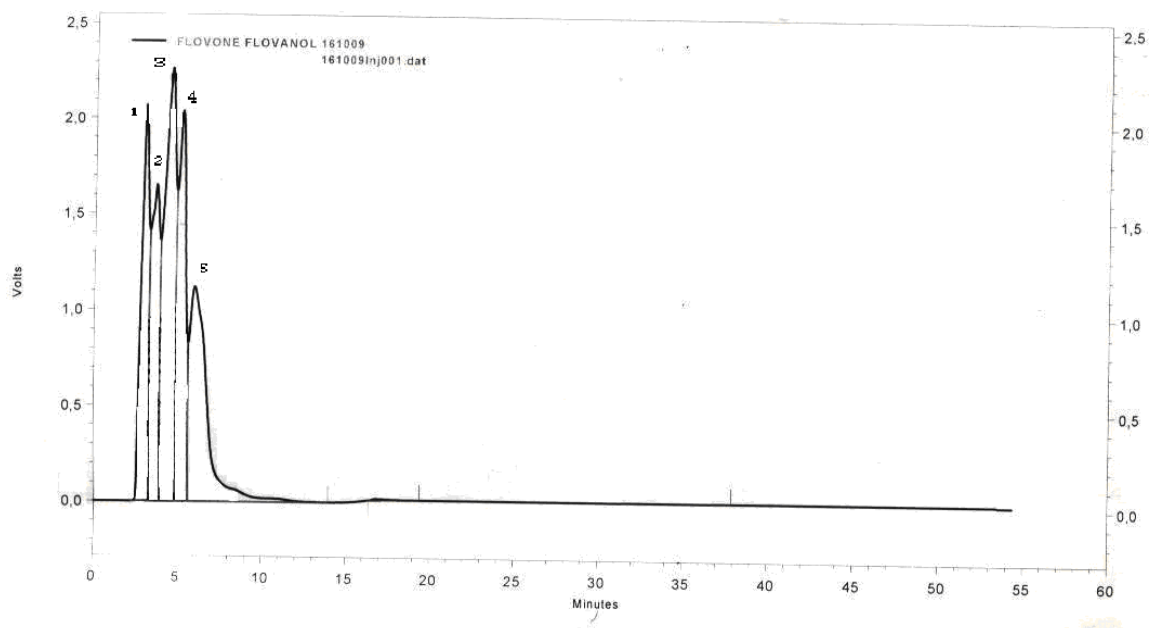


Figure 26. Profil chromatographique représentant les acides phénols détectés par C.L.H.P à 260 nm en mode gradient d'élution.

Les pics obtenus sont bien séparés. La comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de la bibliographie (Ouafi, 2007) et des étalons injectés dans les mêmes conditions (Acide dicafeoyl 4-5 quinique et Acide chlorogénique) nous a permis de détecter la présence de 05 acides phénols dont les caractéristiques sont regroupées dans le **tableau 14**.

Tableau 14. Caractéristiques chromatographiques des acides phénols de l'extrait étheré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 260 nm.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Teneur relative (%)
1	2.975	Acide dicafeoyl 3-5 quinique	22.69
2	3.617	Acide dicafeoyl 3-4 quinique	18.07
3	4.492	Acide dicafeoyl 4-5 quinique	24.61
4	5.142	Acide chlorogénique (cafeoyl 3 quinique)	22.3
5	5.950	Acide coumarique	12.3

A partir de ce tableau nous relevons que les 5 composés identifiés sont tous de la série cinnamique avec une forte présence (notable à partir des teneurs relatives) de l'acide

chlorogénique et ses 3 isomères (pics 1, 2 et 3).

1.2.2. Identification des aglycones libres par la C.L.H.P

L'analyse de l'extrait méthanolique (récupéré à partir de la phase étherée) par C.L.H.P à la longueur d'onde 365 nm nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la **figure 27**.

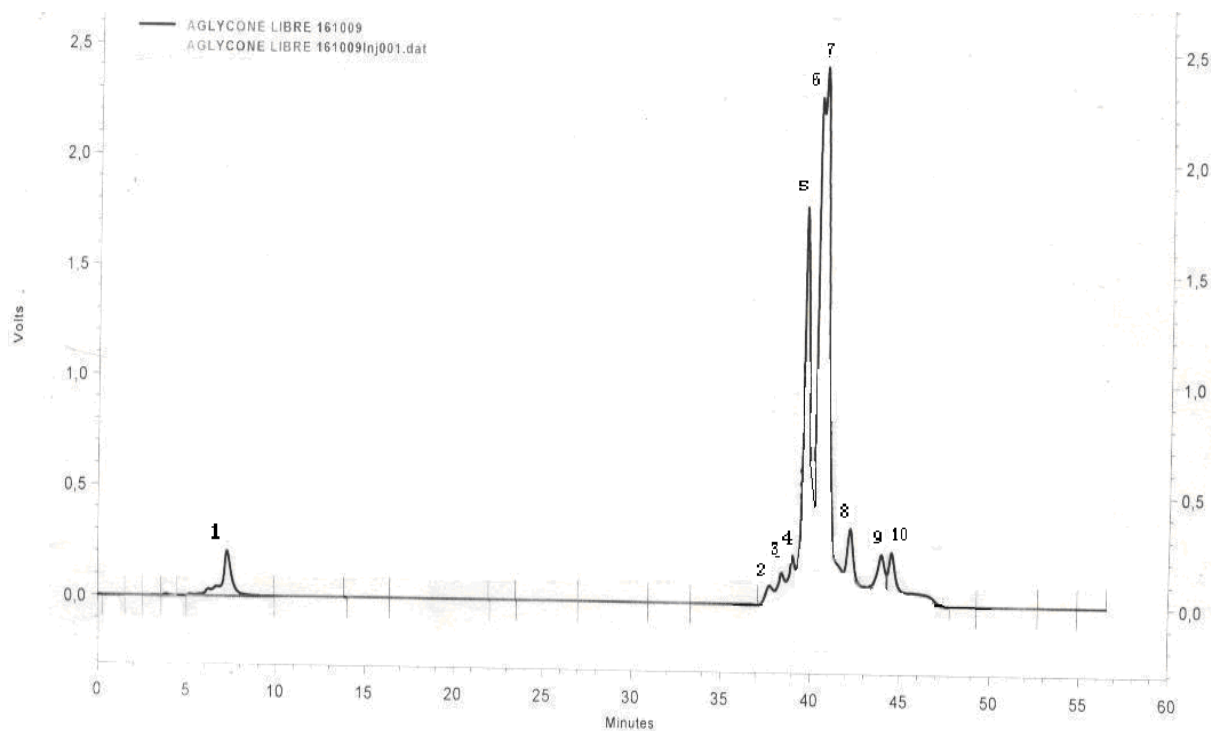


Figure 27. Profil chromatographique représentant les aglycones libres détectés par C.L.H.P à 365 nm en mode gradient d'élution.

La comparaison des temps de rétention avec ceux de la bibliographie (Ouafi, 2007) permet l'identification de 10 composés flavoniques (**Tableau 15**) :

5 Flavones: Lutéoline, Chrysoeriol, Tricine, Naringénine et Apigénine.

4 Flavonols: Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnétine et Kaempférol.

1 Flavanonol: Taxifoline.

Tableau 15. Caractéristiques chromatographiques des aglycones libres de l'extrait étheré de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 365 nm.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Teneur relative (%)
1	7.24	Taxifoline	2.85
2	37	Lutéoline	0.95
3	38.8	Quercétine	1.9
4	39	Kaempférol	2.85
5	39.650	Isorhamnétine	22.38
6	40.683	Chrysoeriol	28.57
7	41.00	Tricine	30.47
8	42.175	Rhamnétine	4.28
9	43.933	Apigénine	2.85
10	44.492	Naringénine	2.85

Nous remarquons que les deux composés Rhamnocitrine et Taxifoline 7 méthyl sont présents dans l'extrait étheré après hydrolyse et absents dans l'extrait étheré obtenu sans hydrolyse ce qui signifie qu'ils existent dans cette plante à l'état substitué (O- glycosides).

De plus, en considérant les teneurs relatives des composés mis en évidence, nous pouvons déduire que les flavones sont dominants à l'état libre avec une somme des teneurs égale à 65.69 % par rapport à celle des flavonols libres avec seulement 31.41 %.

1.2.3. Identification des C-glycosides par la C.L.H.P

Le passage en C.L.H.P de l'extrait contenant les C-glycosides flavoniques à 370 nm dans le mode gradient d'élution nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la **figure 28**.

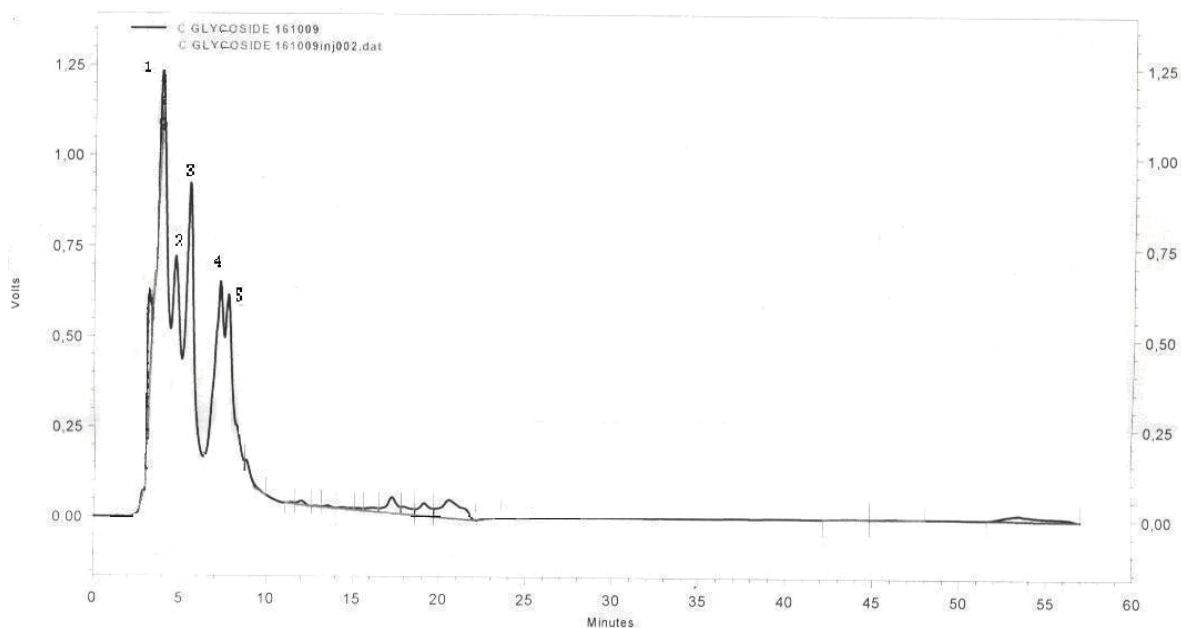


Figure 28. Profil chromatographique représentant les C-glycosides détectés par C.L.H.P à 370 nm en mode gradient d'éluion.

La comparaison des temps de rétention avec ceux de la bibliographie (Lebreton, 1967 ; Ouafi, 2007) permet l'identification de 5 C-glycosides dont les caractéristiques sont regroupées dans le **tableau 16**.

Le pic majeur figurant sur le profil chromatographique correspond à l'Orientine.

Tableau 16. Caractéristiques chromatographiques des C-glycosides de l'extrait butanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 370 nm.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Teneur relative (%)
1	3.167	Mono-C-Lutéoline (Orientine)	28.23
2	3.867	Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine)	17.64
3	4.22	Di-C-Lutéoline	21.96
4	7.28	Mono-C-Apigénine (Vitexine)	16.47
5	7.75	Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine)	15.68

A partir de ce tableau nous pouvons dire que tous les C- glycosides identifiés ont pour génine des flavones. Ce sont donc des C- glycoflavones.

1.2.4. Identification des hétérosides flavoniques par la C.L.H.P

Le passage en C.L.H.P de l'extrait contenant les hétérosides à 370 nm dans le mode gradient d'élution nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la **figure 29**.

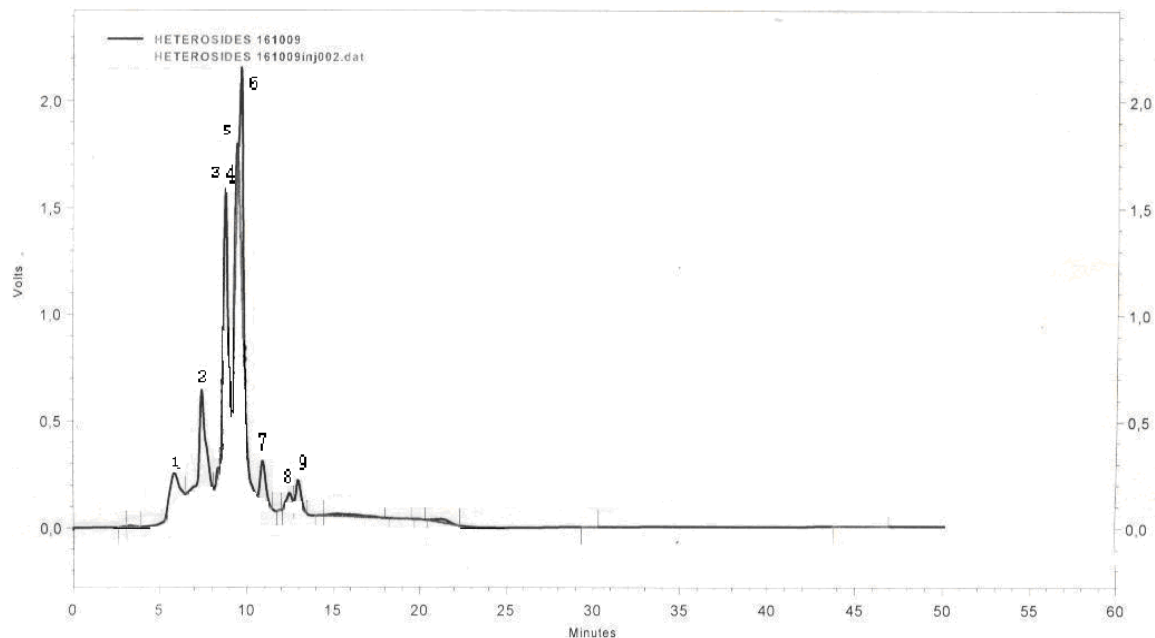


Figure 29. Profil chromatographique des hétérosides flavoniques détectés par C.L.H.P à 370 nm en mode gradient d'élution.

La comparaison des temps de rétention avec ceux de la bibliographie (Lebreton, 1967 ; Ouafi, 2007) et des étalons injectés de certains de ces composés (Iso-vitexine, Orientine) permet l'identification de 9 hétérosides (**Tableau 17**).

4 C-glycosides: Mono-C-Lutéoline (Orientine), Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine), Mono-C-Apigénine (Vitexine) et Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine).

5 O-glycosides: Rhamnoglucoside 3 Quercétine (Rutine), Glucoside 7 Isorhamnétine, Glucoside 7 Lutéoline, Glucoside 7 Chrysoeriol et Glucoside 7 Tricine.

Par comparaison avec le chromatogramme des C-glycosides flavoniques, en plus des 4 C-glycosides initialement révélés, nous avons trouvé une autre molécule : la Di-C-Lutéoline.

Tableau 17. Caractéristiques chromatographiques des hétérosides contenus dans l'extrait hydro éthanolique de *Inula viscosa* (L.) identifiés par C.L.H.P à 370 nm.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Teneur relative (%)
1	5.850	Mono-C-Lutéoline (Orientine)	3.6
2	7.433	Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine)	8.55
3	8.375	Rhamnoglucoside 3 Quercétine (Rutine)	3.6
4	8.775	Glucoside 7 Lutéoline	21.62
5	9.425	Glucoside 7 Isorhamnétine	24.32
6	9.650	Glucoside de Chrysoeriol	28.82
7	10.933	Glucoside 7 Tricine	4.05
8	11.908	Mono-C-Apigénine (Vitexine)	2.25
9	12.475	Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine)	3.15

Discussion :

La C.L.H.P a révélé la présence d'un flavanonol (Taxifoline 7 méthyl), 5 acides phénols de la série cinnamique (Acide chlorogénique et ses trois isomères : Acide dicafeoyl 4-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-4 quinique et l'Acide coumarique) et de 2 O-glycosides (Glucoside 7 Lutéoline et Glucoside 7 Isorhamnétine) non révélés par C.C.M.

La C.C.M nous à permis de mettre en évidence la présence d'un acide phénol (l'acide caféique), de 6 C-glycosides (Mono-C-Tricine, Mono-C-Quercétine, Mono-C-Kaempférol, Di-C-Apigénine, Di-C-Apigénine (iso), Di-C-Tricine) et 4 O-glycosides (Rhamnoglucoside 7 Tricine, Rhamnoside 7 Chrysoeriol, Galactoside 3 Isorhamnétine, Galactoside 3 Quercétine) non identifiés par C.L.H.P.

Nous avons remarqué que certains composés détectés par C.C.M ne l'ont pas été par la C.L.H.P. Ceci serait dû à la polarité du solvant utilisé dans la phase mobile de la C.L.H.P et les proportions du gradient utilisé. Ce qui nous a donné des pics larges à la base et qui se composeraient en fait de un ou deux composés ayant des temps de rétention très proches. Nous pouvons conclure que les deux techniques chromatographiques sont complémentaires.

En comparant les résultats obtenus dans notre présent travail avec ceux de la bibliographie nous constatons que cette étude confirme la présence de 8 aglycones flavoniques (Lutéoline, Naringénine, Apigénine, Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnétine, Rhamnocitrine) et un

flavanonol (Taxifoline 7 méthyl) déjà identifiés par Grande (1985), Wollenweber et *al.* (1991), Máñez et *al.* (1999), Levizo (2004) avec en plus la mise en évidence pour la première fois de la présence d'aglycones libres à l'état natif chez *Inula viscosa* (L.) et de 4 nouveaux aglycones isolés après hydrolyse acide :

2 Flavones : Tricine et Chryseoriol.

1 Flavonol : Kaempférol.

1 Flavanonol :Taxifoline.

Nous avons également identifié pour la première fois 6 nouveaux acides phénols (Acide caféique, Acide chlorogénique et ses trois isomères : Acide dicafeoyl 4-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-4 quinique et l'Acide coumarique). Ortal et *al.* (2009) n'ont révélé qu'un acide phénol (Acide dicafeoyl 1-3 quinique). En plus de l'existence de 11 C-glycosides et de 9 O-glycosides. Benayache et *al.* (1991) ont détecté la présence d'un seul O-glycoside (Glycoside de Quercétine). Grande (1985) a révélé un seul O-glycoside (Glycoside 7 Isorhamnétine). Aucun travail n'a concerné les anthocyanes dont nous affirmons l'inexistence chez le Magramene.

En conclusion notre plante est très riche en composés phénoliques. En effet nous avons détecté un grand nombre de composés appartenant à différentes classes : des flavones-flavonols (libres et combinés à des sucres) des hétérosides flavoniques natifs en majorité des C-glycosides, des acides phénols de la série cinnamique.

1.3. Analyse quantitative des composés phénoliques par spectrophotométrie

L'étude quantitative des composés phénoliques est réalisée par dosage spectrophotométrique des 35 individus étudiés. Un dosage spectrophotométrique différentiel (par chélation au chlorure d'aluminium) est effectué à une longueur d'onde de 430 nm pour les flavones-flavonols (extrait étheré après hydrolyse acide), aglycones libres (extrait étheré sans hydrolyse acide) et hétérosides (extrait hydro éthanolique).

Un dosage spectrophotométrique (sans chélation) est effectué à une longueur d'onde de 340 nm pour les C-glycosides (extrait butanolique).

Les teneurs absolues en composés phénoliques sont exprimées en mg par gramme de poudre végétale. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 18**.

Tableau 18.

Individus	Composés phénoliques			
	Flavones - flavonols	Hétérosides flavoniques	Aglycones libres	C-glycosides
1	1,39	1,80	0,75	0,34
2	0,38	1,05	0,72	0,60
3	0,72	1,90	0,85	0,37
4	1,13	2,70	1,00	0,33
5	1,27	2,30	0,82	0,37
6	0,75	2,10	0,49	0,47
7	0,76	1,60	0,45	0,53
8	0,55	2,65	0,63	0,33
9	0,59	1,00	0,87	0,34
10	0,68	3,00	0,68	0,29
11	0,45	1,60	0,59	0,45
12	0,61	2,60	0,67	0,37
13	0,55	1,10	0,66	0,40
14	0,68	2,70	0,78	0,55
15	0,59	2,20	0,72	0,34
16	0,31	2,10	0,38	0,42
17	0,87	2,10	0,27	0,39
18	0,55	1,60	0,41	0,42
19	0,49	1,20	0,35	0,29
20	0,76	1,70	0,55	0,33
21	0,68	1,50	0,37	0,81
22	0,44	1,00	0,53	0,55
23	0,49	1,60	0,52	0,42
24	0,59	1,35	1,04	0,18
25	0,91	1,50	0,38	0,32
26	0,82	1,20	0,40	0,37
27	0,64	1,30	0,59	0,30
28	0,66	1,10	0,52	0,53
29	0,75	1,60	0,45	0,42
30	0,86	1,80	0,55	0,37
31	0,76	1,60	0,61	0,30
32	1,04	1,80	0,75	0,69
33	0,68	1,10	0,79	0,28
34	0,83	1,30	0,70	0,30
35	0,72	1,65	0,96	0,51
Moyenne	0,71	1,73	0,62	0,41
Variance	0,05	0,30	0,04	0,02
Ecart- type	0,23	0,54	0,19	0,13
Coefficient de variation	32,39%	31,21%	30,64%	31,70%

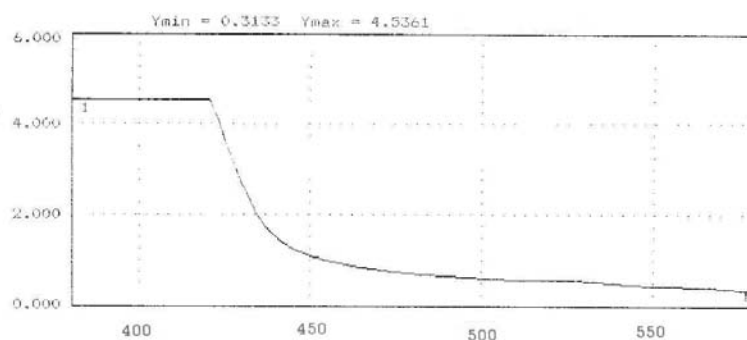


Figure 30. Spectre d'absorption des anthocyanes de *Inula viscosa* (L.) détecté par spectrophotométrie UV-visible.

Ce graphe montre que : entre la longueur d'onde 600 nm et 450 nm (domaine d'absorption des anthocyanes qui est le visible) il n'y a eu aucune absorption ce qui confirme le résultat obtenu par chromatographie sur papier à savoir que la plante étudiée est dépourvue d'anthocyanes.

1.3.1. Analyse de la diversité de l'espèce *Inula viscosa* (L.) par rapport aux variables chimiques mesurées.

Nous avons effectué une analyse statistique des 35 individus étudiés. Cette dernière a pour but l'étude de la diversité au sein de l'espèce *Inula viscosa* (L.) et ce par rapport à quatre variables qui sont : les teneurs absolues en composés phénoliques (aglycones libres, flavones

- flavonols, C-glycosides et hétérosides) le **tableau 18** à servi de matrice pour les différentes analyses statistiques.

1.3.1.1. Analyse factorielle

a. ACP sur les variables

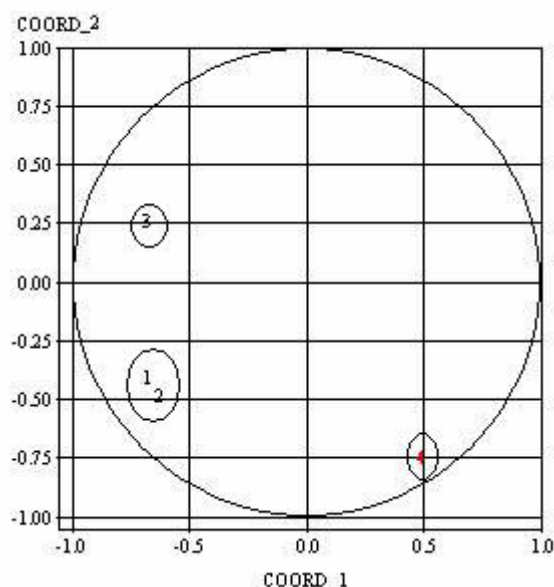


Figure 31. Projection des variables étudiées sur les axes de l'ACP normée centrée.

Var1: Aglycones flavoniques après hydrolyse acide; Var2 : Hétérosides flavoniques;
 Var3 : Aglycones flavoniques sans hydrolyse acide; Var4 : C-glycosides flavoniques.
 COORD_1: 70%, COORD_2: 60%.

La projection des variables étudiées Var1, Var2, Var3, Var4 sur l'axe de l'ACP normée fait apparaître d'un côté les 3 variables Var 1, Var 2, Var 3 avec une proximité des variables Var1, Var2 qui s'opposent à Var 4 sur l'axe des Y. Pour comprendre cette disposition un **tableau 19** de corrélation entre les variables a été réalisé.

Tableau 19. Tableau de corrélation entre les variables étudiées.

	Var1	Var 2	Var 3	Var 4
Var1	1	0.18	0.51	-0.12
Var 2	0.18	1	0.95	-0.12
Var 3	0.51	0.95	1	-0.41
Var 4	-0.12	-0.12	-0.41	1

Le tableau de corrélation ($p < 0.05$) montre que les variables 1. 3. 2 sont corrélées positivement entre elles du fait qu'elles représentent des composés flavoniques dont la synthèse emprunte la

même voie métabolique. Par contre elles sont corrélées négativement à la variable 4 qui représente les C-glycosides. Ceci s'explique par l'antagonisme qui existe entre ces composés et le reste des composés flavoniques dans la voie de biosynthèse.

b. Projection des observations dans le nuage des variables

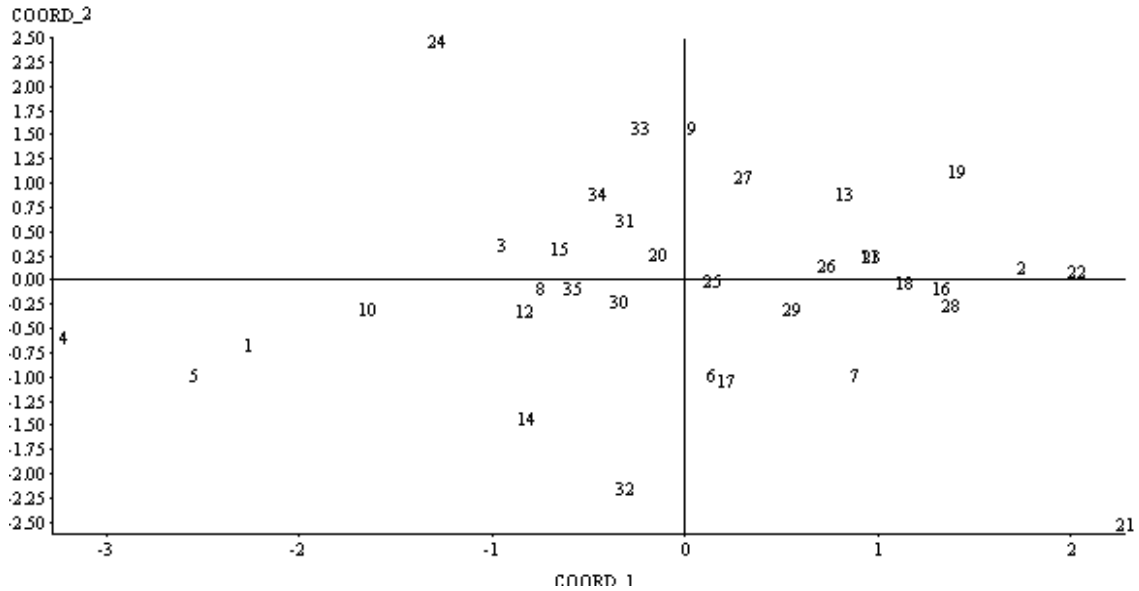


Figure 32. Projection des 35 individus sur les axes de l'ACP.
(COORD_1: 79%, COORD_2: 50%).

Les individus se disposent de façon aléatoire (nuage dispersé) sur l'axe de l'ACP ce qui indique la présence d'une forte variabilité au sein de la population analysée.

1.3.1.2. Classification hiérarchique ascendante (CAH)

a. CAH à partir de l'ACP des variables.

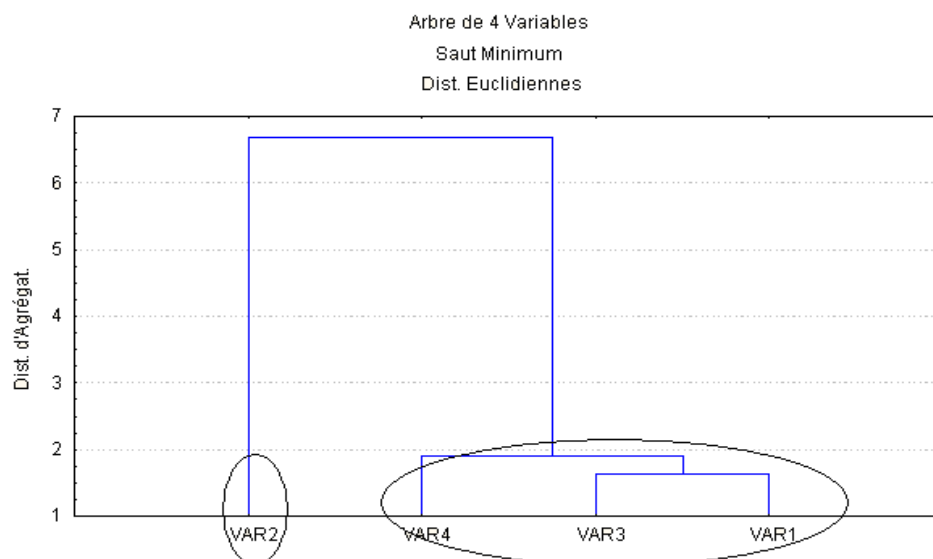


Figure 33. Dendrogramme issu de la CAH portant sur les quatre variables étudiées.

Le dendrogramme obtenu sur la base de la distance euclidienne du moment d'ordre deux, montre une première coupure qui oppose d'un côté la Var 2 (Hétérosides) et d'autre part le groupe représenté par (Var1, Var3, Var4). La deuxième coupure oppose la Var 4 (C-glycosides) aux (Var1, Var3) qui sont les aglycones flavoniques (libres et libérés après hydrolyse acide). Cette disposition se fait donc par classe de composés et par la valeur absolue des variables.

La projection des individus en fonction des variables montre que les variables 1, 2, 3 sont des variables de dispersion car les individus se disposent de façon aléatoire, alors qu'avec la variable 4 ils ont tendance à s'agréger ce qui fait apparaître certains individus confondus (**Figure 34**).

Nous constatant l'existence de 4 pôles respectivement définis par les variables 2 et 4.

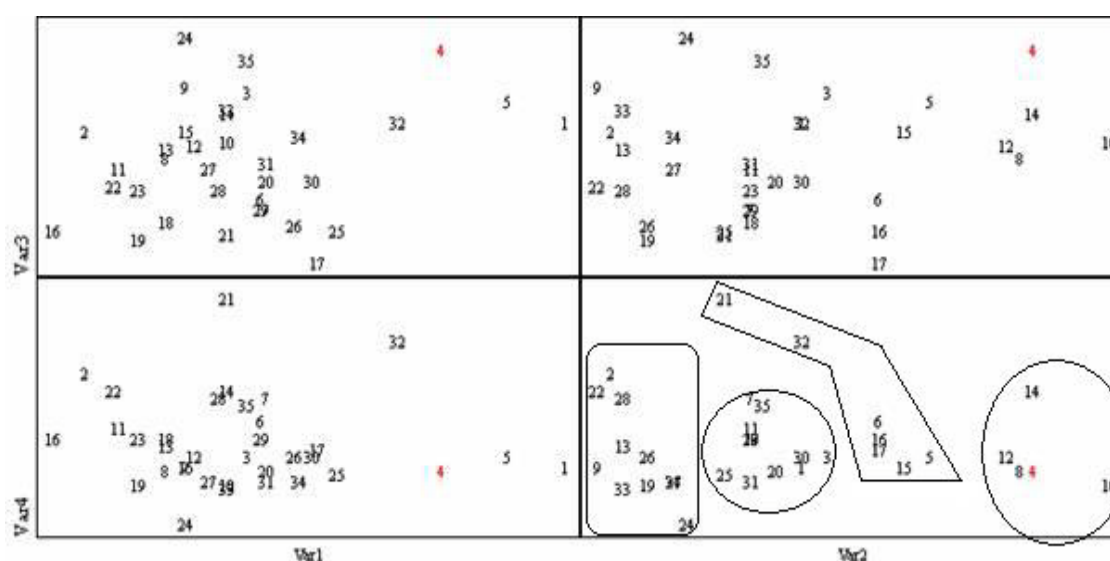


Figure 34. Projection des individus en fonction des variables étudiées deux à deux.

b. Classification ascendante hiérarchique à partir de l'ACP des individus étudiés

L'application de la classification ascendante entre les 6 premières coordonnées factorielles de l'ACP est représentée dans la figure ci-dessous. Les coupures ont été déterminées, elles expriment des niveaux d'agrégation qui traduisent une bonne qualité de classification (**Figure 35**).

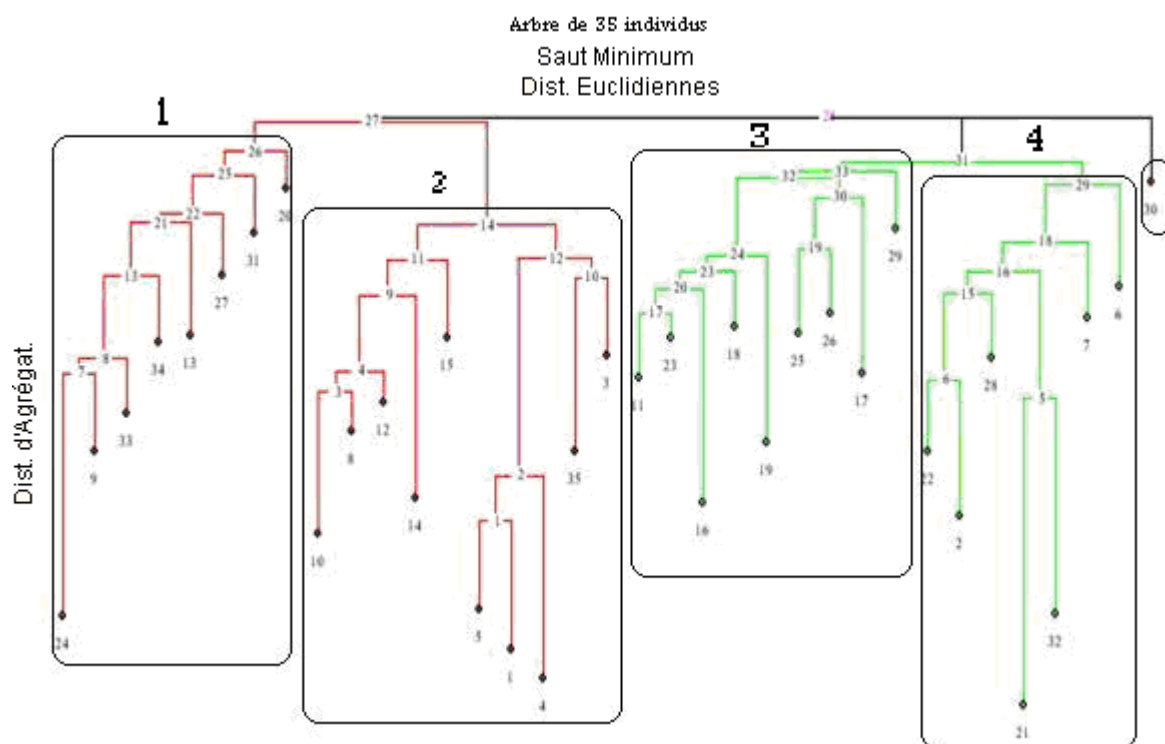


Figure 35. Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur les 35 individus étudiés.

Nous avons reconnu quatre groupes qui correspondent à quatre chémotypes différents.

L'individu n°30 reste mal attribué sur cette ACP centrée. En conclusion les individus étudiés se répartissent en quatre chémotypes distincts ce qui dénoterait de l'éventualité de la présence de clones dans l'espèce *Inula viscosa* (L.).

2. Tests antimicrobiens

Après la période d'incubation si les germes cibles sont sensibles aux extraits de *Inula viscosa* (L.) leur croissance s'arrête. Il se forme alors une zone d'inhibition autour du disque dont le diamètre varie selon la sensibilité du germe.

2.1 Activité antibactérienne et antifongique (levures)

Nous avons effectué dans cette partie des antibiogrammes vis-à-vis des souches bactériennes (Gram+ et Gram-), et des antifongogrammes concernant des levures en examinant les extraits phénoliques et aqueux de *Inula viscosa* (L.).

En parallèle, nous avons testé les solvants de récupération des molécules extraites. Il s'agit du n-butanol, du méthanol, et de l'éther di éthylique. Ce test a été réalisé dans le but de confirmer que les solvants ne présentent aucun effet sur la croissance normale des souches

microbiennes. D'après Yrjonen (2004) si les extraits doivent être soumis aux essais antimicrobiens, la toxicité du solvant peut également être critique car même en trace, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique.

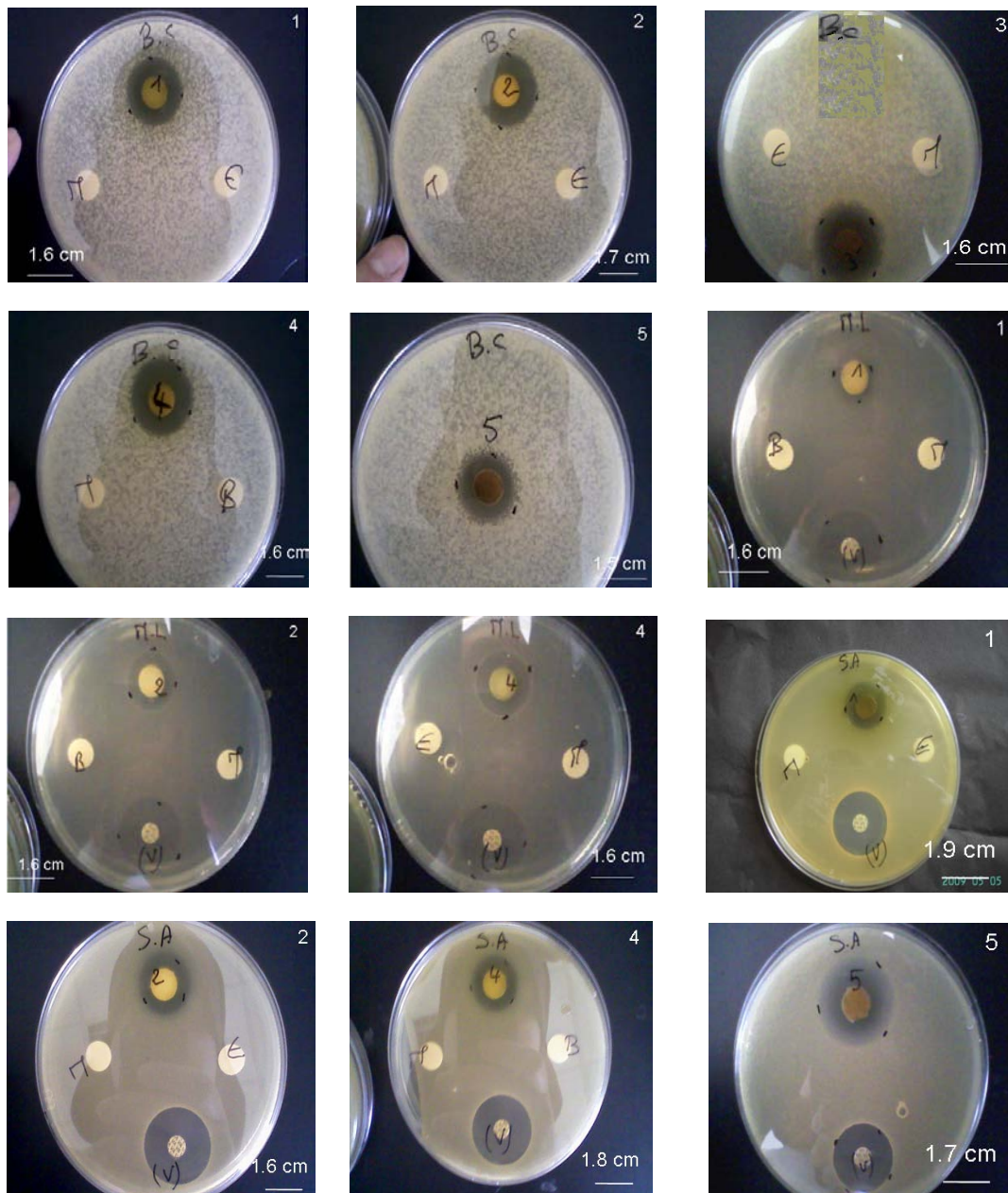
Nous avons choisi trois antibiotiques (ATB) commerciaux les plus disponibles pour comparer leur effet par rapport aux extraits du Magramane.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 20**, et illustrés par les **figures 36; 37 et 38**.

Tableau 20. Les diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.).

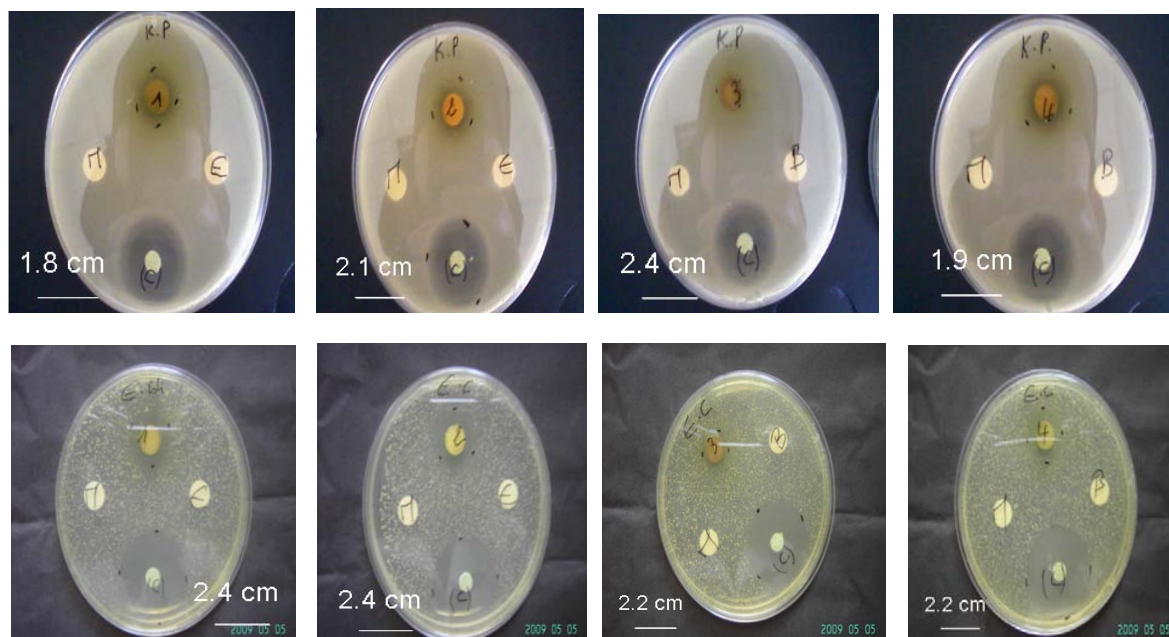
ATB+Extraits		(V)	(C)	(I)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Souches									
Bactéries Gram+	<i>S. aureus</i>	20	-	-	18	20	11	19	22
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	22	23	20	23	20
	<i>M. luteus</i>	19	-	-	15	18	12	19	0
Bactéries Gram-	<i>K. pneumoniae</i>	-	24	-	15	18	16	20	0
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	20	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	-	20	-	20	19	13	18	0
Levures	<i>C. albicans</i>	-	-	-	20	20	0	20	18
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	11	11	11	11	0

(1):Flavones-flavonols; (2):Aglycones libres; (3): C-glycosides; (4): Hétérosides; (5): Extrait aqueux; (V):Vancomycine; (C):Céfotaxime; (I):Imipénème.



B.c: *Bacillus cereus*, **M.I:** *Micrococcus luteus*, **S.a:** *Staphylococcus aureus*
ATB : Vancomycine (V); **E:**Disque imbibé par Ether diéthylique; **B:** Disque imbibé par Butanol.
M : Disque imbibé par Méthanol; **Extraits 1:** Flavons-flavonols; **2:** Aglycones libres;
3: C-glycosides; **4:** Hétérosides; **5:** Extrait aqueux.

Figure 36. Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur les bactéries Gram+.



K.p: *Klebsiella pneumoniae*, **E.c:** *Escherichia coli*.
ATB : Céfotaxime (C). **E:**Disque imbibé par Ethère diéthylique. **B:** Disque imbibé par Butanol.
M: Disque imbibé par Méthanol. **Extraits 1:** Flavons-flavonols, **2:** Aglycones libres,
3: C-glycosides. **4:** Hétérosides.

Figure 37. Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur les bactéries Gram-



E:Disque imbibé par Ethère diéthylique; **B:** Disque imbibé par Butanol; **M:** Disque imbibé par Méthanol.**Extrait 1:** Flavons-flavonols. **2:** Aglycones libres. **4:** Hétérosides.

Figure 38. Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur *Candida albicans* (C.a).

D'après les **figures 36, 37 et 38** nous avons constaté que tous les disques imbibés par les 3 types de solvants précédemment cités n'ont exercé aucun effet inhibiteur sur la croissance des germes.

Les moyennes des zones d'inhibition des ATB commerciaux varient légèrement et sont comprises entre 20 et 24 mm. En comparant les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes vis-à-vis des extraits de *Inula viscosa* (L.) avec ceux des antibiotiques commerciaux. Nous constatons que l'effet des extraits de cette plante est parfois similaire aux antibiotiques commerciaux comme le cas de l'extrait des aglycones libres, des hétérosides et des flavones-flavonols successivement sur *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Escherichia coli*. Cet effet est parfois plus important, cas de l'extrait aqueux vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Concernant l'effet des extraits de notre plante: nous constatons que *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* sont résistantes à l'extrait aqueux. Par contre les souches *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont respectivement très sensibles et extrêmement sensibles à cet extrait.

Pour les extraits phénoliques, la souche *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à ces derniers. La souche *Saccharomyces cerevisiae* est sensible. Pour ce qui est des souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* sont très sensibles ou extrêmement sensibles.

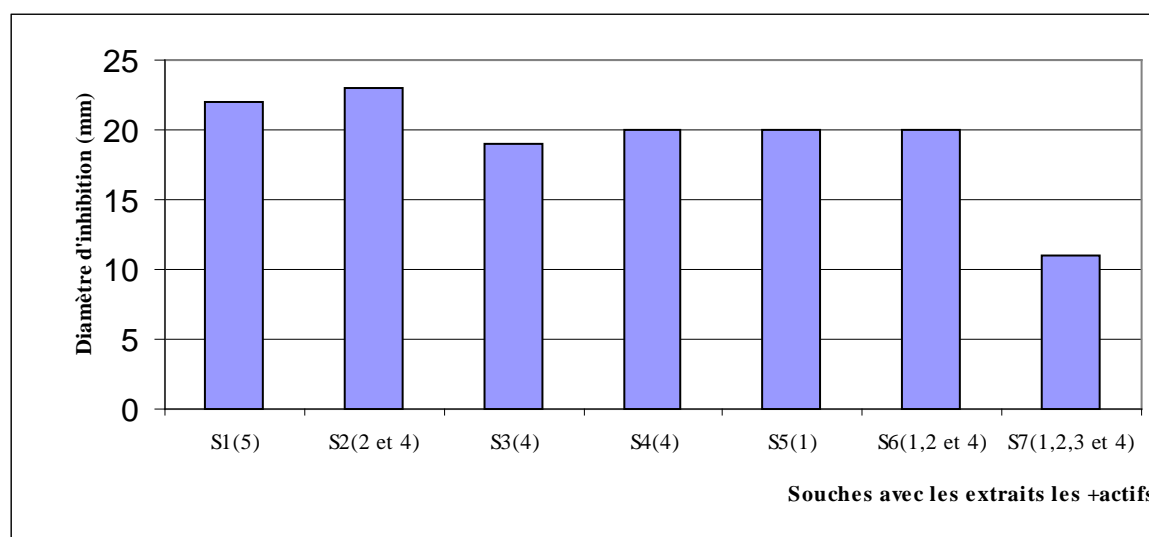
Nous remarquons qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques de la culture bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette souche possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne des extraits (phénoliques et aqueux) de *Inula viscosa* (L.).

Nous concluons que l'extrait aqueux est inactif sur la majorité des souches à l'exception de trois d'entre elles. Cela pourrait être dû à un antagonisme entre les substances présentes dans le filtrat aqueux brut.

Les extraits phénoliques sont par contre actifs sur la majorité des souches. Nos résultats corroborent, d'une part, les travaux de Ali-Shtayeh et al. (1998); Maoz et Neeman, (1998) qui ont noté une activité antibactérienne des extraits de *Inula viscosa* (L.) vis-à-vis des bactéries à Gram+ et à Gram- et d'autre part ceux de Bssaibis et al. (2009) qui parlent d'une très bonne activité antibactérienne de cette plante contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Un criblage de l'activité antimicrobienne nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extrait qui présente le plus grand pouvoir inhibiteur parmi l'ensemble de ceux que nous avons testé.

La **figure 39** représente le classement des souches microbiennes (bactéries et levures) d'après le diamètre de zone d'inhibition de croissance le plus élevé pour chaque souche et les extraits qui ont permis son obtention.



S1: *S. aureus*; S2: *B. cereus*; S3: *M. luteus*; S4: *K. pneumoniae*; S5: *E. coli*; S6: *C. albicans*; S7: *S. cerevisiae*.
 (1): Flavones-flavonols; (2): Aglycones libres; (3): C-glycosides; (4): Hétérosides;
 (5): Extrait aqueux.

Figure 39. Résultat du criblage du pouvoir antimicrobien des extraits réalisé par la méthode des disques.

Les flavones-flavonols donnent le plus grand diamètre d'inhibition de croissance chez *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

Les aglycones libres donnent le plus grand diamètre d'inhibition de croissance chez *Bacillus cereus* et *Candida albicans*.

Les C-glycosides donnent le plus grand diamètre d'inhibition de croissance chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les hétérosides donnent le plus grand diamètre d'inhibition de croissance chez *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*.

L'extrait aqueux donne le plus grand diamètre d'inhibition de croissance chez *Staphylococcus aureus*.

En outre, nous remarquons que les extraits phénoliques donnent le même diamètre de zone d'inhibition (11 mm) chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Parmi les composés phénoliques les C-glycoside s'avèrent les moins actifs vis-à-vis de l'activité antimicrobienne

2.2. Activité antifongique (moisissure phytophatogène)

La méthode employée est celle du contact direct qui consiste à additionner aseptiquement les extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.) aux milieux de culture en état de fusion.

Les résultats de l'effet de ces extraits sur *Fusarium oxysporum* forma specialis *albedinis* sont indiqués dans le **tableau** ci-dessous et sont illustrés par **la figure 40** et **41**.

Tableau 21. Diamètres de croissance (mm) et indices antifongiques (%) de *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* sous l'action des différents extraits de *Inula viscosa* (L.).

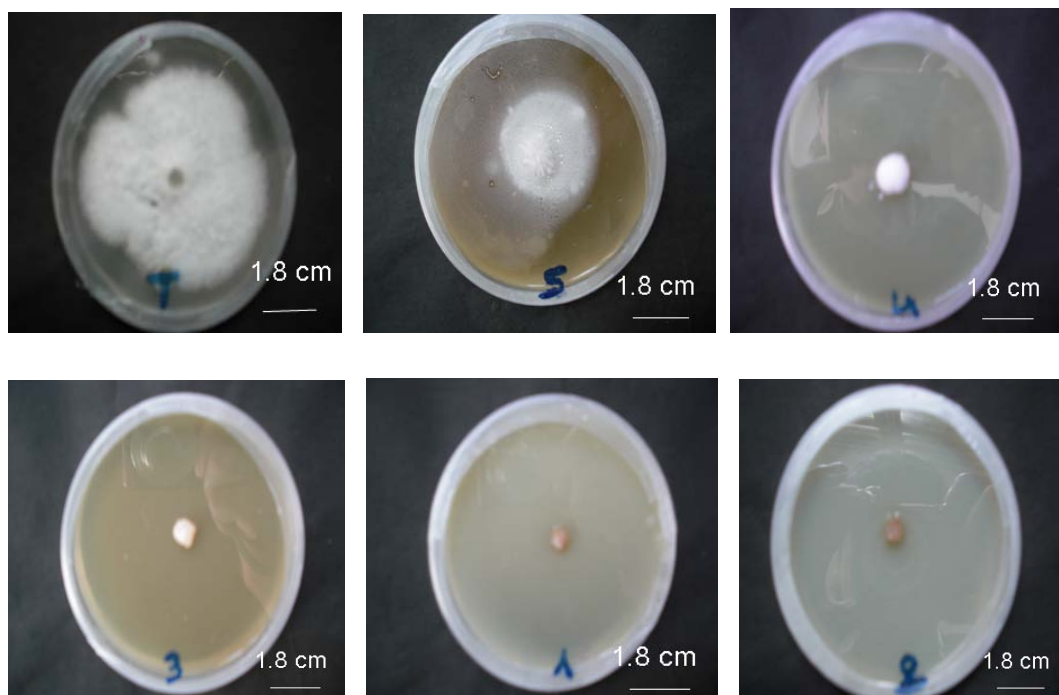
	Témoin	Flavones-flavonols (1)	Aglycones libres (2)	C-glycosides (3)	Hétérosides (4)	Extrait aqueux (5)
Diamètre de croissance (mm)	75	0	0	10	15	40
Indice Antifongique =IA (%)	0	100	100	86.6	80	46.66

En ce qui concerne le témoin, le *Fusarium oxysporum albedinis* croit et envahit toute la surface du milieu de culture. Ainsi, l'indice antifongique calculé est de 0.

En effet, l'extrait aqueux semble agir moyennement sur l'inhibition du *Fusarium oxysporum albedinis*. Cela se traduit par un IA de 46.66%. Les extraits des hétérosides et C-glycosides dont les IA calculés sont respectivement de 80% et 86.6% révèlent une très bonne action inhibitrice sur le champignon d'où la faible propagation de ce dernier.

Enfin, les extraits de flavones-flavonols et aglycones libres semblent être les plus efficaces du fait qu'ils inhibent totalement ce champignon et l'empêchent de se propager dans les boîtes de Petri. Cet effet parfaitement inhibiteur ressort par le calcul des IA où l'on enregistre un maximum de 100%.

De nos résultats il ressort que l'activité antimicrobienne est liée aux composés phénoliques de *Inula viscosa* (L.). En effet, Stavrianakou et al. (2005) ont démontré que l'activité antimicrobienne peut s'expliquer par le fait que la plante produit différents métabolites secondaires appartenant à des classes chimiques connues.



T: Témoin; **Extrait 1**: Flavons-flavonols; **2**: Aglycones libres; **3**: C-glycosides; **4**: Hétérosides;
5: Extrait aqueux.

Figure 40. Photos montrant les zones d'inhibition obtenues par l'action des extraits phénoliques et aqueux des feuilles de *Inula viscosa* (L.) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.

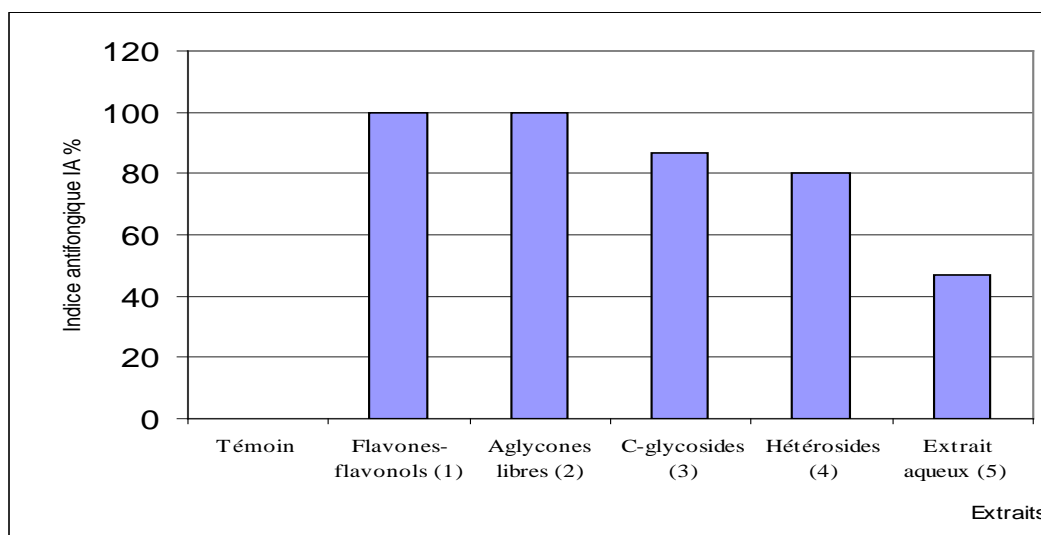


Figure 41. Résultat du pouvoir antifongique des extraits de *Inula viscosa* (L.) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.

3. Activité cicatrisante cutanée

Le pouvoir cicatrisant sur les plaies d'excision de la poudre végétale de *Inula viscosa* (L.) est évalué selon les critères suivants :

la durée de la cicatrisation totale, le diamètre des surfaces des plaies concernant l'étude morphologique et la réorganisation tissulaire pour ce qui est de l'étude histologique.

3.1. Etude morphologique

-L'activité cicatrisante s'est révélée synchrone chez les 2 lots (SE) et (ST+) à J14.

-Les surfaces des plaies traitées par la plante ont été comparées à celle traitées par le produit de référence "Banéocin" en calculant le pourcentage de réduction à partir des moyennes des surfaces des plaies. Les résultats sont illustrés par les **tableaux 22** et **23** et par la **figure 42**.

Tableau 22. Moyennes des surfaces des plaies (cm²) calculées pour chaque lot à trois jours d'intervalle.

Moyenne cm ² (M)	J0	J4	J7	J9	J11	J14
Banéocin®	1,80	1,69	1,20	0,79	0,55	0,19
<i>Inula viscosa</i>	2,03	1,78	1,58	1,33	0,85	0,28

Tableau 23. Pourcentages de réduction des plaies (%) calculés pour chaque lot à trois jours d'intervalle.

Pourcentage de réduction (%)	J 0	J4	J 7	J9	J 11	J14
Banéocin®	0	6,18	33,05	55,96	69,55	89,68
<i>Inula viscosa</i>	0	12.31	22.16	34.48	58.12	86.20

SE : lot de souris essai; ST+ : lot de souris témoin traités au Banéocin..

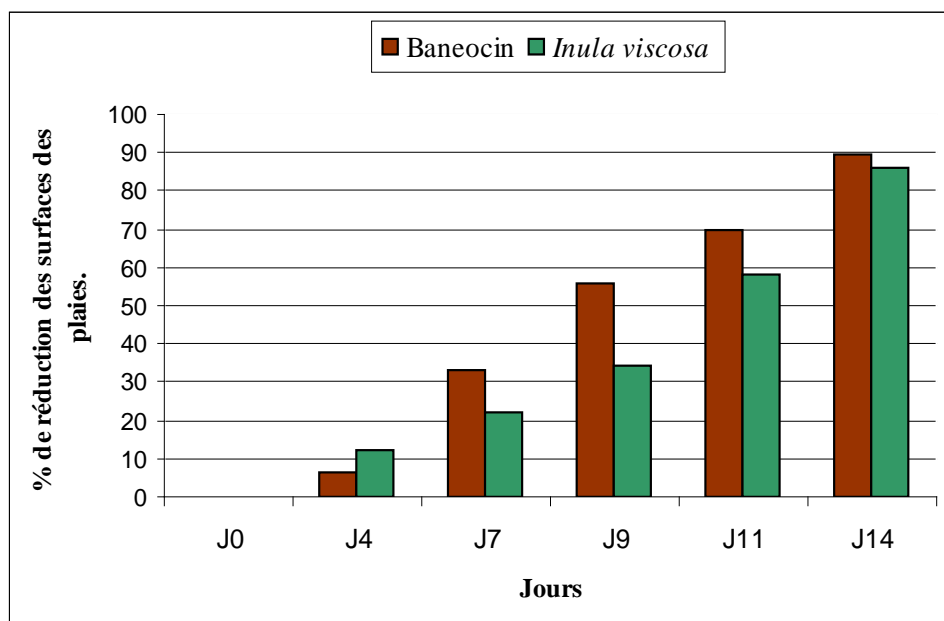


Figure 42. Histogramme des pourcentages de réduction des surfaces des plaies traitées par le Banéocin et la poudre végétale de *Inula viscosa* (L).

Cet histogramme montre que la cicatrisation des plaies se fait en 3 étapes :

1^{ère} étape de J0 à J4 : Le pourcentage de réduction des plaies traitées par la poudre végétale est supérieur à celui des plaies traitées par Banéocin. Donc la plante induit un meilleur début de cicatrisation.

2^{ème} étape de J4 à J11 : Le pourcentage de réduction des plaies traitées par le Banéocin est supérieur à celui des plaies traitées par la poudre végétale. On constate un ralentissement de l'activité cicatrisante de *Inula viscosa*(L).

3^{ème}étape de J11 à J14 : Les pourcentages de réduction des surfaces des plaies chez les individus des lots (SE) et (ST+) sont très proches (86.2 % et 89.68 %).

Pour confirmer le résultat obtenu à J14 nous procédons à la comparaison des moyennes des surfaces de la cicatrisation ce jour là. Cette dernière est basée sur l'écart-réduit ($p = 5\%$).

La valeur absolue de l'écart-réduit obtenue est de $\epsilon = 0.79$. Elle est inférieure à celle donnée par la table de Student (2.14).

On conclut qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux moyennes. Les deux traitements ont la même efficacité.

3.2. Etude histologique

Pour confirmer les résultats obtenus par l'étude morphologique, nous procédons à une étude histologique en effectuant des coupes au niveau des tissus cicatrisés chez le lot (SE) et (ST+)

au dernier jour de cicatrisation (J14) une fois les individus sacrifiés (**Figure 43**).

D'après Césarini et Liliane (1981), Vérola (2006) une cicatrisation proprement dite est caractérisée par les critères histologiques suivants (**Annexe 7**):

- un épiderme bien développé en épaisseur avec la présence des crêtes dermiques au niveau de la couche granuleuse.
- une raréfaction des réseaux vasculaires (néocapillaires) dans le tissu conjonctif du derme.
- une réorganisation des tissus selon les lignes de tension (horizontalisation).

Par comparaison des photographies obtenues dans la **figure 43** nous remarquons :

-une réépithélialisation de la peau par une réorganisation des tissus selon des lignes de tension (horizontales) et par la présence d'une couche cornée bien structurée (**Figure 43a et 43c**) et ce chez les individus des deux lots.

-un épiderme bien développé avec la formation des crêtes dermiques et une raréfaction des néocapillaires dans le tissu conjonctif sont observées uniquement chez les individus traités par la poudre végétale de *Inula viscosa* (L.). D'après l'aspect lisse de l'épiderme et la présence de plusieurs néo capillaires nous concluons que la cicatrisation faite par le Banéocin est incomplète (**Figure 43b et 43d**).

L'analyse histologique montre une différence de cicatrisation en profondeur chez les individus traités par le Banéocin et ceux traités par *Inula viscosa* (L.).

Le processus de cicatrisation peut être expliqué en partie par l'activité antibactérienne de notre plante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* précédemment démontrée lors de l'étude antimicrobienne. En effet, cette bactérie s'avère responsable des staphylococcies cutanées et de l'infection des plaies retardant ainsi la cicatrisation.

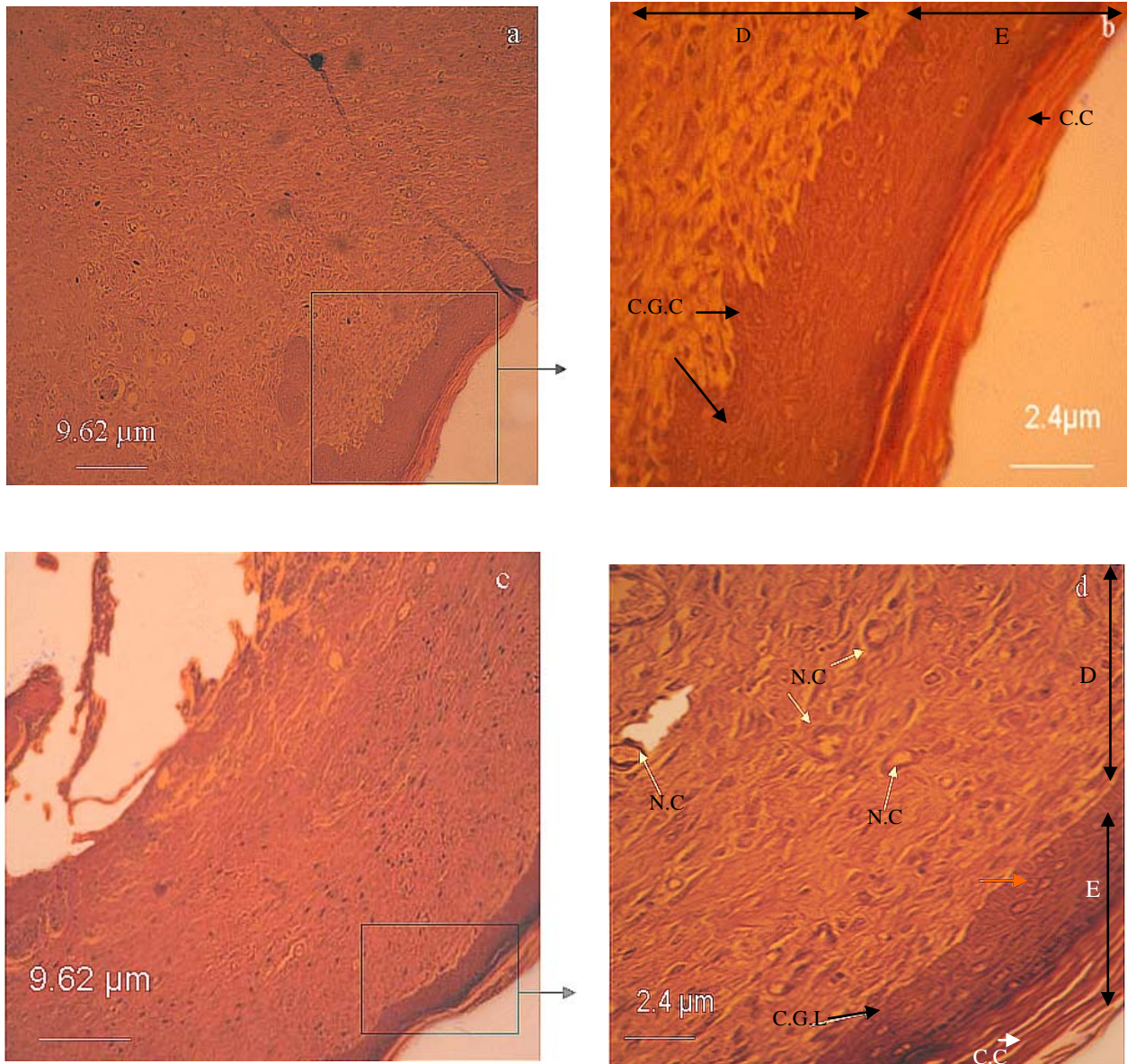
En effet, nos résultats ont démontré une bonne activité cicatrisante de *Inula viscosa* (L.) confirmant son utilisation en médecine traditionnelle.

4. Activité antiulcéreuse

Dans cette partie nous allons tester l'effet du décocté et de l'extrait flavonique de *Inula viscosa* (L.) sur l'ulcère gastrique qui a été provoqué par un antiinflammatoire "la phénylbutazone".

Pour se faire, nous devons suivre 2 étapes:

une confirmation de l'effet ulcéreux de PBZ et une évaluation de l'effet antiulcéreux de *Inula viscosa* (L.)



C.G.C: couche granuleuse avec crêtes dermique; C.C: couche cornée; C.G.L: couche granuleuse lisse
 D: derme; E: épiderme; N.C: néocapillaire.

Figure 43. Evaluation histologique des plaies traitées par *Inula viscosa* (L.) (a+b) et par le Banéocin (c+d) à J14 (cicatrisation proprement dite).

4.1. Activité ulcéreuse de la phénylbutazone (PBZ)

D'après Bourin et *al.* (1993) l'induction d'ulcère stomacale a des signes qui sont : la perte de poids et l'irritation de la paroi stomacale avec la présence des sillons ou points hémorragiques. Pendant les 4 jours de l'administration de la phénylbutazone (test ulcéreux) nous avons noté les poids moyens de 7 rats de chacun des lots, dont les résultats sont représentés par la **figure 44**.

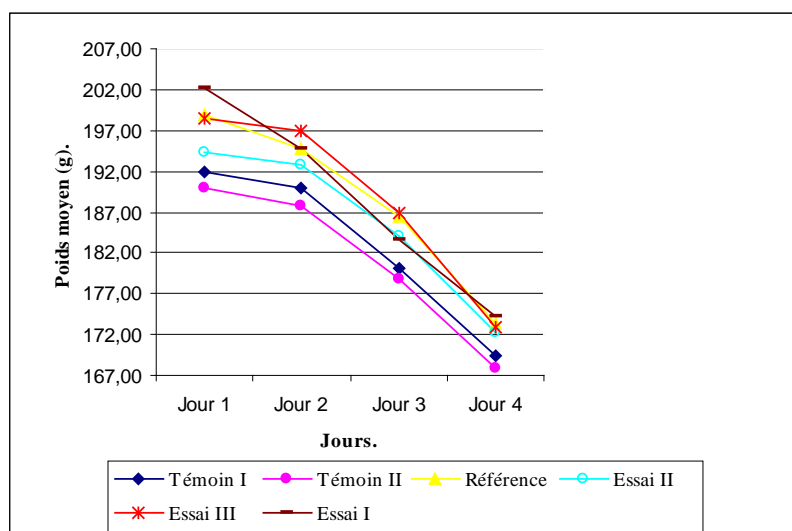


Figure 44. Evolution pondérale des six lots de rats traités à la phénylbutazone

A partir de ce graphe, nous constatons chez tous les individus une perte de poids due probablement à des ulcères.

Après le 4^{ème} jour, les rats du lot témoin I sont sacrifiés et soumis à un examen macroscopique (après dissection) à la loupe pour déceler la présence d'ulcères (**Figure 45**).

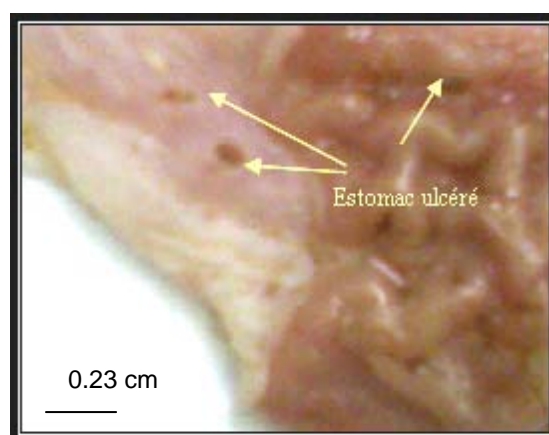


Figure 45. Vue macroscopique d'un estomac ulcéré.

Nous constatons que tous les individus de ce lot ont l'estomac irrité et présentent des ulcères avec des points d'hémorragie.

Donc la présence d'ulcères est confirmée chez les rats des autres lots.

4.2. Evaluation de l'activité antiulcéreuse.

Pour les six lots restants le lot n° 2 servira de témoin pour cette deuxième partie. On administrera de la Ranitidine comme référence, l'extrait flavonique au lot essai I, le décocté du Magramane à 250 mg/kg au lot essai II, celui à 500 mg/kg au lot essai III.

Selon la cotation de Lowff (voir protocole expérimental), on peut évaluer le nombre d'ulcération chez les rats. Ce dernier permet de trouver la somme de la cotation et l'indice d'ulcération pour chaque lot. Les résultats sont exprimés dans le **tableau** ci-dessous

Tableau 24. Effet de l'extrait flavonique et des décoctés de *Inula viscosa* (L.) sur l'ulcère induit par la phénylbutazone chez les rats.

Lots \ Rats	1	2	3	4	5	6	7	Somme des cotations	Indice d'ulcération
Témoin II.	3	2	mort	mort	3	2	mort	10	271.42
Extrait flavonique.	0	0	2	1	0	0	0	3	12,24
Décocté à 250 mg/kg.	2	1	0	0	1	1	1	6	61
Décocté à 500 mg/kg.	1	0	0	0	1	1	1	4	32
Ranitidine.	1	0	0	0	0	2	2	5	31

D'après ces résultats, l'indice d'ulcération le plus haut est enregistré chez les individus témoins (271.42) avec trois rats morts. Cette mortalité n'est pas enregistrée pour les autres lots et étroitement liée à l'ulcère. Notons que ces rats n'ont subi aucun traitement.

Cet indice est de 61 chez les individus traités par le décocté à 250 mg/kg et environ 31 chez les individus traités par le décocté à 500 mg/kg et par la Ranitidine.

L'indice le plus faible est enregistré chez les individus traités par l'extrait flavonique (12.24) où nous concluons que c'est le meilleur traitement.

A fin de confirmer les résultats précédents nous avons fait une comparaison des variances observées par l'ANOVA à un facteur avec $p = 5\%$, sur 4 colonnes représentées par les 4 traitements. La valeur absolue de l'écart-réduit obtenue est de 6.8. Celle-ci est supérieure à

celle donnée par la table de Fisher (3.01) ce qui traduit une différence significative entre les traitements administrés (pour les calculs voir **annexe 8**).

A noter que les résultats sont les mêmes pour l'ANOVA et l'indice d'ulcération concernant le traitement le plus efficace.

En 1988, Alarcon De La Lastra et *al.* ont administré un extrait flavonique de *Inula viscosa* (L.) en prétraitement à des rats rendus ulcéreux par des agents nécrotiques (éthanol pur, HCL). Ils ont constaté une augmentation de la sécrétion muqueuse gastrique chez les individus traités diminuant ainsi la gravité de l'ulcère. Martin et *al.* (1988) ont prouvé l'efficacité de l'extrait flavonique de *Inula viscosa* (L.) principalement la Quercétine, dans le traitement de l'ulcère gastrique.

En 2002, Silva et *al.* ont prouvé l'activité antiulcéreuse de *Inula viscosa* (L.) qui est due à l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Helicobacter pylori* germe présent au niveau des zones ulcérées.

Nos travaux sur *Inula viscosa* (L.) Algérienne confirment ceux des auteurs précédemment cités.

*Conclusion générale
et perspectives*

Notre travail est une contribution à l'analyse des composés phénoliques présents dans les feuilles d'une plante médicinale *Inula viscosa* (L.), et de leurs activités biologiques.

L'étude phytochimique a pour premier objectif une extraction et une analyse quantitative et qualitative des différents composés phénoliques (flavones-flavonols, aglycones libres, C-glycosides, hétérosides).

L'analyse quantitative par dosage spectrophotométrique UV visible des quatre extraits de composés phénoliques de *Inula viscosa* (L.) nous a permis d'évaluer les teneurs moyennes en flavones, flavonols : $0.71 \text{ mg/g} \pm 0.23$, en hétérosides : $1.71 \text{ mg/g} \pm 0.54$, en aglycones libres : $0.62 \text{ mg/g} \pm 0.19$ et en C-glycosides : $0.41 \text{ mg/g} \pm 0.13$.

L'analyse qualitative par C.C.M mono et bidimensionnelle et par C.L.H.P nous a permis d'identifier les composés phénoliques suivants:

-5 flavones : Lutéoline, Chrysoeriol, Tricine, Naringénine et Apigénine.

-5 flavonols: Isorhamnétine, Quercétine, Rhamnocitrine, Rhamnétine et Kaempférol.

-2 flavanols : Taxifoline et Taxifoline 7 méthyl.

-6 Acide phénols de la série cinnamique: Acide caféique, Acide chlorogénique et ses trois isomères: Acide dicafeoyl 4-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-5 quinique, Acide dicafeoyl 3-4 quinique et l'Acide coumarique.

-11 C-glycosides: Mono-C-Tricine, Mono-C-Lutéoline (Orientine), Mono-C-Lutéoline (Iso-orientine), Mono-C-Apigénine (Vitexine), Mono-C-Apigénine (Iso-vitexine), Mono-C-Quercétine, Mono-C-Kaempférol, Di-C-Lutéoline, Di-C-Apigénine, Di-C-Apigénine (iso) et Di-C-Tricine.

-9 O-glycosides: Rhamnoglucoside 3 Quercétine(Rutine), Glucoside 7 Lutéoline, Galactoside 3 Isorhamnétine, Galactoside 3 Quercétine, Rhamnoside 7 Chrysoeriol, Glucoside 7 Tricine, Rhamnoglucoside 7 Tricine, Glucoside 7 Chrysoeriol et Glucoside 7 Isorhamnétine.

Les analyses quantitatives et qualitatives ont montré que notre plante est très riche en flavonoïdes glycosylés, mais pauvre ou dépourvue d'anthocyanes.

Les résultats de la recherche de la diversité polyphénolique intraspécifique ont montré que les individus étudiés se répartissent en quatre chémotypes distincts ce qui dénoterait de l'éventualité de la présence de clones dans l'espèce *Inula viscosa* (L).

L'étude phytochimique des composés polyphénoliques issus des extraits de feuilles de *Inula viscosa* (L.) a été complétée par des tests microbiologiques via des bactéries (Gram+ et Gram-), levures et moisissure phytopatogène.

Les résultats obtenus à partir de ces tests ont montré que *Inula viscosa* (L.) possède une activité antibactérienne et antifongique dues principalement aux flavonoïdes.

Le pouvoir antifongique le plus élevé a été décelé pour *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*.

L'espèce *Inula viscosa* (L.) est une plante très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement des plaies et des ulcères ce qui nous a conduit à faire une étude de l'activité cicatrisante cutanée et antiulcéreuse (gastroduodénale) dont les résultats sont les suivants:

- la poudre végétale a effectivement un pouvoir cicatrisant sur les plaies d'excision avec un pourcentage de réduction des surfaces des plaies de 86%, une très bonne réorganisation tissulaire et une bonne ré épithélialisation révélées par des coupes histologiques.

- l'effet antiulcérogénique positif est dû à la composition flavonique de *Inula viscosa* (L.).

Malgré la maîtrise d'une grande partie de ce travail, il serait intéressant de procéder ultérieurement à :

- une analyse de tous les extraits de cette plante de façon plus approfondie en utilisant des techniques plus développées (LCMS, RMN,..),
- une approche moléculaire de l'espèce pour la confirmation de l'éventuelle présence de clones,
- des tests cliniques sur les principes actifs de cette plante et leur application en pharmacognosie pour la fabrication de remèdes notamment des pommades et des comprimés.

_____ *Références bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abu Zarga M. H., Hamed E. M., Sabri S. S., Voelter W. & Zeller K. P., 1998. New sesqui terpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa* (L.). *Journal of Natural Products*, 61: p798-800.

Abu Zarga M. H., Sabri S. S., Hamed E. M., Khanfar M. A., Zeller K. P. & Attaur-R., 2003. A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Products Research*, 17: p99-102.

Alarcon de la lastra C., Lopez A. & Motilva V., 1988. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Phytotherapy Research*, Vol 2 (4): p183-186.

Al-Dissi N. M., Salhab A. S. & Al-Hajj H. A., 2001. Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 77: p117–121.

Al-Eisawi D., 1998. Field Guide to Wild Flowers in Jordan and Neighboring Countries. Jordan. Foundation Press, Amman, 97 p.

Ali-Shtayeh M. S., Yaghmour R. M. R., Faidi Y. R., Salem K. & Al-Nuri M. A., 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60 : p265-271.

Ali-Shtayeh M. S., Yaniv Z. & Jamal M., 2000. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 73 : p221-232.

Alluis B. & Dangles D., 1999. Acylated flavone glycosides. Synthesis, conformational investigation, and complexation properties. *Helvetica chemical Acta*, Vol 82 : p2201-2212.

Andersen Ø. M. & Markham K. R., 2006. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Informa. London New York. 1197 p.

Andray C., 1993. Caffeic acid glycosid esters and pharmacology in polyphenolic phenomena. INRA, Paris. p238-245.

Aouinty B., Oufara S., Mellouki F. & Mahari S., 2006. Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (L.), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aiten) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Enviro*, 10 (2): p67-71.

APG II., 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: p399-436.

Audigie C. & Zonszain F., 1991. Biochimie structurale. Doin, 226 p.

Ay F. & Zouache F., 2007. Extraction des huiles essentielles et des concrètes de l' Inule visqueuse. Mém. Ing. Génie Chimique ENP, Alger, 94 p.

Barbetti P., Chiappini I., Fardella G. & Menghini A., 1985. A new eudesmane acid from *Dittrichia (Inula) viscosa*. *Planta Medica* 51, 471 p.

Bärtels A., 1998. Guide des plantes du bassin méditerranéen. Ulmer. 400p.

Bate-Smith E. C., Ostone L. & Lermioglu F., 1954. Leucoanthocyanidins II, the nature and distribution in leaves. *Planta medica*, p34-37.

Bayer E., Buttler K. P., Finkenzeller X. & Grau J., 1990. Guide de la flore méditerranéenne, Niestlé. 287p.

Baytop T., 1984. Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Istanbul, 167 p.

Bell E. A. & Charl W., 1980. Secondary plant products. Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag Berlin Heidelberg. New-york. Vol 8 : 674 p.

Bellakhdar J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis. 764p.

Benayache S., Benayach F., Dendougui H. & Jay M., 1991. Les flavonoides de *Inula viscosa* (L.) *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome 25. N°4 : p170-176.

Berche P., Gaillard J. L. & Simonet M., 1989. Les bactéries de l'infection humaine, Bactériologie clinique, Paris. p101-276.

Bergogne - Berzin E., 2002. *Pseudomonas aeruginosa*, son rôle dans les infections respiratoires, phase 5, P 87. In Bekaouassa N. & Garti N. Recherche de l'activité antibactérienne des polyphénols des feuilles du *Balanites aegyptiaca* (L.) Mém. Ing. Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene (USTHB), 80p.

Bezenger - Beauquesne L., 1987. Plantes médicinales et phytotérapie, Tome 21 : 79-93. In Bouchaita M., Tidjini Y. Contribution à la caractérisation et l'identification des composés phénoliques du Pacanier (*Carya illinoensis*) et leurs effets antimicrobiens. Mém. Ing. Univ. Sc. Agro- vétérinaire et bio. Blida, 170p.

Bickley J. C., 1991. Vegetable tannins and tanning. *journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 76: p1-5.

Bonnier G., 1934. Flore complète. Tome 2. France, Suisse, Belgique. 354p.

Boulos L., 1983. Plantes médicinales de l'Afrique du Nord. Référence Publication, Etats-Unis. 120p.

Bourgeois C. M. & Leveau J. Y., 1980. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaires, Tome 3: le contrôle microbiologique, 2ème Ed. Lavoisier, Paris, 454p.

- Bourin M., Lievre M. & Allain H., 1993.** Cours de pharmacologie. Ellipse. Paris, 351p.
- Brouillard R., Jay M. & Scalberat A., 1995.** 17^{ème} journée internationale d'étude des polyphénols, communication 94. I.N.R.A, France, Vol 1, 209p.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Tech et doc. Lavoisier, 1120p.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. *Techniques et documentation*. Lavoisier. Paris, 915p.
- Bssaibis F., Gmira N. & Meziane M., 2009.** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, Vol 3, N°1 : p44-55.
- Bulit J., Louvet J., Bouhot D. & Toutain G., 1967.** Recherches sur les fusarioses. I. Travaux sur le Bayoud, Fusariose du Palmier Dattier en Afrique du Nord. *Ann. Epiphyties*, 18; (2), 213-239. In Bounaga N. Quelques aspects de la physiologie d'une souche de *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*, agent de la maladie du "Bayoud" : 138-181. Bull. Soc Hist naturelle de l'AFN. Faculte des sciences d'Alger, 1970, Tome 60 (3 et 4), 198p.
- Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M. A., Losacco V. & Puccini V., 2002.** Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (L.) (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, 44 : p153-156.
- Cavallo J. D., Chardon H., Chidiac C., Choutet P., Courvalin P., Dabernat H., Drugeon H., Dubreuil L., Goldstein F., Jarvalier V. R., Leclerc Q. M. H., Nicolas-Chanoine, Philipon A., Quentin C., Rouveix B., Sirot J. & Soussy C. J., 2006.** Communiqué de la Comité Française de l'Antibiogramme. *Société Française de Microbiologie*. p180-210.
- Césarini J. & Liliane S., 1981.** La peau. 1^{er} Ed. presses universitaires de France, 127 p.
- Chang S. T., Wang S. Y., Wu C. L., Su Y. C. & Kuo Y. H., 1999.** Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* 53 : p487-490.
- Chang S. T., Wang S. Y., Wu C. L., Su Y. C. & Kuo Y. H., 2000.** Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* 54 : p241-245.
- Chiappini I., Fardella G., Menghini A. & Rossi C., 1982.** Flavonoids from *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica* 44 : p159-161.
- Chifundera k., Bury W. M. & Kizungub., 1990.** Screening phytochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomorus*-short communication. *Fitoterapia* 6 : p535-539.
- Ciccarelli D., Garbari F. & Pagni A., 2007.** Glandular haire of the ovary: a helpful character for Asteroideae taxonomy, *Ann. Bot. Fennici*, Vol 44: p1-7.
- Coste H., 1983.** Flore descriptive et illustrée de la France du corse, *Société de la botanique de France*, Paris, 627 p.

Dafni A., Yaniv Z. & Palevitch D., 1984. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northern Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 10 : 295–310.

Davidson P. M. & Branden A. L., 1981. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *Journal of Food Protection*, Vol 44, (8) : p623-632.

De Lamarck Mm. & De Andolle., 1815. Flore française, Vol 4, 3^{ème} Ed. Paris. 400p.

Del Mar Herrador M., Fernández Barrero A. & Catalán J. V., 2008. Des scientifiques utilisent l'inule visqueuse, une plante silvestre qui pousse dans la Méditerranée, pour obtenir des médicaments anti-cancérigènes. Service de communication. *Fitoterapia* 2 : p545-560.

Didry E., 1982. Sur la composition chimique et l'activité du tissulage. *Annale pharmaceutique française* 40 N° 1 : p75-80.

Fattorusso V., 2001. Dictionnaire de poche des médicaments. 4000 médicaments dont les médicaments génériques. Pocket, Masson. 790p.

Flandrois J. P., 1997. Bactériologie médicale, Presse universitaires, Lyon, 309p.

French C. J. & Tozersg H., 1992. Inhibit of infectivity of potato virus X by flavonoïds. *Phytochemistry*, 31 (9) : p3017-3220.

Frobisher F., 1976. Microbiologie clinique, HRW, 507p.

Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Masson, Paris, 113 p.

Gazengel J. & Orecchioni A., 2001. Le préparateur en pharmacie, Technique et documentation, Paris, 271p.

Gavrilovic M., Maginot M., Schwatz C. & Wallach J., 1996. Manipulation d'analyse biochimique, 3^{ème}Ed. Doin, Paris, 453 p.

Ghestem A., Seguin E., Paris M. & Orecchioni A. M., 2001. Le préparateur en pharmacie, dossier 2, botanique- pharmacognosie phytothérapie- homéopathie, Tech et Doc, Paris. p108-117.

Grande M., Piera F., Cuenca A., Torres P. & Bellido I. S., 1985. Flavonoids from *Inula viscosa* (L.). *Planta Medica*. p415- 419.

Guignard J. L., 2000. Biochimie végétale, 2^{ème} Ed. Dunod, Paris. 274p.

Gerhard R., 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie, Ed française, presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 526p.

Hadj-Mahammed M., 1992. Analyse des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince, 1^{er} journée de chromatographie, institut de chimie, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, p1-3.

- Halimi A., 2004.** Les plantes médicinales en Algérie, Beraki, 300 p.
- Harborne J. B., 1973.** Phytochemical méthodes, guide to modern technique of plant analysis, Chapman and Hall, London, 378p.
- Harborne J. B., 1993.** New naturally occurring plant polyphenols. *In* Scalbert A. Polyphenolic phenomena. Ed INRA. 19-22. *In* Vercauteren J. Polyphénols 96. INRA, Paris, p31-43.
- Hernández V., Máñez S., Rechio M. C., Giner R. M. & Rios J. L., 2005.** Anti-inflammatory profile of déhydrocistic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. *European journal of Pahrmaecological Sciences.* Elsevier. 26 : p162-169.
- Hernández V., Recio M. C., Máñez S., Giner R. M. & Ríos J. L., 2007.** Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences* 81 : p480-488.
- Hernández V., Recio M. D. C., Máñez S., Prieto J. M., Giner R. M. & Rios J. L., 2001.** A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. *Planta Medica* 67 : p726-731.
- Heywood V. H., Harborne J. B. & Turner B. L., 1997.** Biology and chemistry of the compositae, Academic press, 411p.
- Hostettman K., Marston A. & Hostettman M., 1998.** Preparative chromatography techniques: Application in natural product isolation, Springer, Berlin, 244 p.
- Idrissi-Hassani M., 1985.** Etude de la variabilité flavonique chez deux conifères méditerranéenne : le pin maritime : *Pinus pinaster* Ait. Et le genévrier thurifere : *Juniperus thurifera* L. Thèse 3^{ème} cycle, université de Lyon I, 171p.
- Isaakides C., 1957.** La lutte biologique contre *Dacus oleae* Gmel. *Entomophaga* 2. p245-249.
- Jacquot C., 1989.** Pharmacologie fondamentale. Ellipse. Paris. 302p.
- Jay M., Achike F. I., Mustafa A. M. & Mustafa M. R., 2005.** Diabetes Research and Chiminal Practice. *Phytothérapie.* p1-7.
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellog E. A. & Stevens P., 2002.** Botanique systématique, 1^{ère} Ed, De Boeck Université. 467p.
- Jurd L. & Geisman T. A., 1956.** Arch biochimie biophysique, N°63, 376p. *In* Hamlat-Lazib N. Etude des flavononoides et des acides phénoliques du lentisque. Mém. Magister. ENS. Alger. 101p.
- Kamoun P., 1997.** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, médecine-science. Flammation, Paris, p96-417.
- Kassel D., 2003.** Des hommes et des plantes, *Histoire de la pharmacie.* *In* : Bouchaita M. & Tidjini Y. Contribution à la caractérisation et l'identification des composés phénoliques du

Pacancier (*Carya illinoensis*) et leurs effets antimicrobiens. Mém. Ing. Univ. Sc. Agro-vétérinaire et bio. Blida, 170p.

Kattouf J., Belmoukhtar M., Harnafim H., Mekhfi H., Ziyat A., Aziz M., Bnouham M. & Legssyer A., 2009. Effet antihypertenseur des feuilles d'*Inula viscosa*. *Phytothérapie* 7: p309-312.

Kelsey R. G., Reynolds G. W. & Rodriguez E., 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In : Rodriguez E., Healey P.L. & Metha J. Biology and chemistry of plant trichomes. Plenum press. New york. p187-241

Khalil E. A., Afifi F. U. & Al- Hussaini M., 2007. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*), *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 109. (1) : p104-112.

Lacaille-Dubois M. A. & Wagner H., 1996. Importance pharmacologique des dérivés polyphénoliques. *Acta Botanica Gallica*, Vol 143. N° 6, p555-562.

Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. & Hseini S., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (Maroc occidental). *ejeunia. Botanique*. 26p.

Lastra C., Lopez A. & Motiva V., 1993. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichie viscosa*. *Planta Medica* 59, p 497-501p.

Lauranson J., 1999. Exploration de la diversité biochimique chez les conifères : Contribution à l'étude de l'hybridation *Pinus uncinata* Ram. X *Pinus Sylvestris* L. et à la croissance du complexe spécifique *Pinus nigra* Am. Thèse d'état, Univ. Claude Bernard – Lyon, 207p.

Lauro L. & Rolih C., 1990. Observation an research on an extract of *Inula viscosa*. *Boll. Soc Italiana Biological Sperimentable* 66, p829-834.

Lebreton P., Jay M., Voirin B. & Boucher M. P., 1967. Analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, *Chimie analytique* N°49, p375-385.

Legendre P. & Legendre L., 1994. Numerical ecology. Developments. *Environmental Modelling* 20, p853.

Lentini F., 2000. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia* 71, p83-88.

Levizou E., Karageorgou P., Petropoulou Y., Grammatikopoulos G. & Manetas Y., 2004. Induction of ageotropic response in lettuce radicle growth by epicuticular flavonoid aglycons of *Dittrichia viscosa*. *Biologia Plantarum* 48 (2): p305-307.

Loret H. & Barrandon A., 1888. Flore de Montpellier .2^{ème} Ed G. Masson. 663p.

Lyle E., 1580. Herbs, spices, and medicinal plants, recent advances in botany, Vol 1, (FPP). 347p.

Mabry T. J., Markham K. R. & Thomas M. B., 1970. The systematic identification of flavonoïds. Springer verlag, Berlin, 354p.

Mahuzier, Hanou H., Ferrier G. & Prognon P., 1999. Abrége de chimie analytique. Méthodes de séparation, Tome 3. Masson, Paris, 312p.

Makris D. P., Kallithraka S. & Kefalas P., 2006. Analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Journal of food Composition and Analysis*. p304-326.

Máñez S., Rechio M. D. C., Gil I., Gomez C., Giner R. M., Waterman P. G. & Rios J. L., 1999. A glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*. *American chemical society and American society of pharmacognosy. J. Nat. Prod.* 62. p601-604.

Maoz M., Kashman Y. & Neeman I., 1999. Isolation and identification of a new anti-fungal sesquiterpene lacton from *Inula viscosa*. *Planta Medica* 65 (3) : p281–282.

Maoz M. & Neeman I., 1998. Antimicrobial effects of aqueous plants extracts on the fungi *Microsporium canis* and *Trichophyton rubrum* and three bacterial species. *Letters en Applied microbiology* 26. p61-63.

Martin M. S., Alarcon de la lastra C., Marhuenda E., Delgado F. & Torreblanca J., 1988. Anti- ulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter in rats. *Biotechnology*. p5-12.

Markham K. R., 1982. Technique of flavonoïds identificqcton, Académie press, London. 103p.

Markham K. R. & Mabry T. J., 1968. The identification of twenty-three 5-deoxy-and ten 5 hydroxy-flavonoids from *Baptisia lecontei* (Leguminosea). *Phytochemistry*, Vol 7: p791-801.

Meaume S., Dereure O. & Teot L., 2001. Plaies et cicatrisations. Masson. 229p.

Messian C. M. & Cassini R., 1968. Recherches sur les fusarioses. IV. La systématique des *fusarium*. In: Bounaga N. Quelques aspects de la physiologie d'une souche de *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*, agent de la maladie du "Bayoud", 138-181. Bull. Soci. Hist. Nat. de l'AFN. Fac. sci. Alger 1970, Tome 60 (3 et 4). 198p.

Mogode D. J., 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse d'état en Pharmacie . Tchad. 243p.

Narendes T., Khaliq T., Puri A. & Chander R., 2006. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. *Journal of food Composition and Analysis*. p3411-3414

Nisreen M., AL-Dissi., Abdulazim S., Salhab., Hameed A. & Alhaj J., 2001. Effects of *Inula viscosa* leaf extract on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 77 (1) : p117-121.

- Ono K. & Barre-Sinoussi F., 1990.** Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* Vol. 190 : p469-476.
- Oran S. A. & Al-Eisawi D. M., 1998.** Check-list of medicinal plants in Jordan. *Dirasat* 25. p84-112.
- Ortal D., Hugo E., Gottlieb, Shlomo G. & Margalit B., 2009.** Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*. p1-8.
- Ouafi S., 1987.** Etude chimio- taxonomie des flavonoïdes des cultivars du Palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. de la station de l'INRA de Adrar. Thèse de magistère, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 125p.
- Ouafi S., 2007.** Contribution à l'étude biochimique du Palmier dattier, analyse des polyphénols des folioles de palme de cultivars du *Phoenix dactylifera* L. dans un but chimiotaxonomique. Thèse d'état en science de la nature, physiologie végétale, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 140p.
- Paris M. & Hurabielle M., 1980.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Masson, Paris. p101-107.
- Paris R. R. & Duret S., 1972.** Contribution à l'étude de la répartition et du métabolisme des flavonoides. Variation des flavonoides chez le laurier rose (*Nerium oleander* L.) au cours de la végétation. *Bull. Soc. Bot. Fr* 119, p531-542.
- Paris R. R. & Moyse H., 1976.** Matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Paris. 447 p.
- Pere E., 1999.** Techniques spectroscopiques en biochimie analytique. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitane, 151p.
- Plummer D. T., 1989.** Introduction aux techniques de biochimie, Mc Graw- Hill, Paris. 331p.
- Quezel P. & Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. C N R S. Paris. 558p.
- Quezel P. & Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. C N R S. Paris. 1087p.
- Ribereau - Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, 254p.
- Romano A., 1997.** Callus induction and micropropagation of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. II Wocmap congress Medicinal and Aromatic Plants. Résumé.
- Rosa A., Deiana M. & Viviana C., 2003.** Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. *Free radical research*. Vol 37, N° 9: p1013-1019.
- Rosler K. A. & Goodwin R. S., 1984.** Flavonoids with anticataract activity from *Vrickellia arguta*. *Journal natural products* 47, p316- 319.

Sanz J. F., Ferrando C. & Marco J. A., 1991. Oxygenated nerolidol esters and eudesmane acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry* 30, p3653-3655.

Sarni - Manchado P. & Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Tec et Doc, Paris. 1-9. *In* Bouchaita M. Tidjini Y. Contribution à la caractérisation et l'identification des composés phénoliques du Pacanier (*Carya illinoensis*) et leurs effets antimicrobiens. Mém. Ing. Univ. Sci. Agro- vétérinaire et bio. Blida, 170p.

Schutt C. & Netzly D., 1991. Effect of apiforol and apigeninidin on growth of selected fungi, *Journal. Chem. Ecol.*, 17, 2261p.

Seigler D. S., 1977. Primary roles for secondary compounds. *Biochem Syst. Ecol.*, 5, p195-199.

Silva D., Denham E., Faleiro L., Miguel G., Cavaleiro C. & Salgueiro L., 2002. Antimicrobial activity of the essential oils of *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa* on *Helicobacter pylori*. Résumé.

Spichiger R., Savolainen V. V., Figeat M. & Jeanmonod D., 2002. Botanique systématique des plantes à fleurs. Collection Biologique, Presses Poly. et universitaires Romandes. 413p.

Statistica (8). Rousseau W. S., Plessis A. & Benade P., 1983. Dépistage des facteurs de risque dans trois communautés rurales. *Afrique du Sud Medical Journal* 64: p430-436.

Stavrianakou S., Liakopoulos G. & Karabourniotis G., 2005. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany* (Elsevier). p293-300.

Stonecipher L. L., Hurley P. S. & Netzley D. H., 1993. Effect of apigeninidin on the growth of selected bacteria, *Journal. Chem. Ecol.*, 19, 1021p.

Swain T., 1974. Comprehensive biochemistry. Elsevier, Amsterdam, 29A. 125-302. *In*: Gaceb-Terrak R. Contribution à l'étude de la fusariose du palmier- dattier (*Phoenix dactylifera* L.) identification des flavonoides. Thèse de magistère, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 170p.

Tassou C. C., 1993. Antimicrobial properties of phenolic extracts. Bath university. 411-420. *In* Hamlat-Lazib N. Etude des flavonoides et des acides phénoliques du lentisque. Mém. Magister. ENS. Alger. 101p.

Trouillas P., Marsal P., Siri D., Lazzaroui R. & Duroux J. L., 2005. Phytochemical methods. *Food Chemistry*, p679-688.

Vercauterne J., 1996. Polyphénols 96. INRA, Paris. p31-43.

Verola O., 2006. Aspects anatomo-pathologiques de la cicatrisation, hôpital Saint-Louis. Paris. 26p.

Warlop F., 2006. Limitation des populations de ravageurs de l'olivier par le recours à la lutte biologique par conservation, *Cahiers Agricultures*, Vol 15, N° 5, p449-455.

Werker E. & Fahn A., 1981. Secretory Hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.-Development, Ultrastructure, and Secretion, *Botanical Gazette*, Vol 142, N° 4. p461-476.

William's C. A. & Harborne J. B., 1993. Flavone and flavonol glycosides. *In*: Harborne J. B. The flavonoïds: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, p337-385.

Winstat @. Perrier X., Passouant M., Letourmy P. & Goze E., 1997. *In*: TUT. XXIX^{èmes} Journées de statistique Carcassonne ASU-SSF, France. p638-641.

Wollenweber E., Mayer K. & Roitman J. N., 1991. Exudate flavonoids of *Inula viscosa* *Phytochemistry*, Vol 30, N°7. p2445-2446.

Yaniv Z., Dafni A., Friedman J. & Palevitch D., 1987. Plants used for treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 19, p145-151.

Yamamoto Y., Osanai S. & Fujiuchi S., 2002. Saccharomyces-induced hypersensitivity pneumonitis in a dairy farmer: a case report, (in Japanese). *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 40 (6) : p484-488.

Yrjonen T., 2004. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural productions. Conférence Room 513 at Viikki infocentre; Faculty of pharmacy of the university of Helsinki. 64p.

Zeggwagh N. A., Ouahidi M. L., Lemhadri A. & Eddouks M., 2006. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 108. (2). p223-227.

Annexes

Annexe 1

- **Milieux de cultures**

Préparation pour 1 litre

- **Gélose Muller Hinton (MH)**

Infusion de viande de bœuf	300 ml
Hydrolysate de Caseine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar agar	10 g
PH= 7.4	

- **Gélose Sabouraud (SAB)**

Peptone pepsique de viande	10 g
Glucose	35 g
Agar agar	15 g
PH= 5.7 ± 0.2	

- **Potatoes Dextrose Agar (PDA)**

Filtrat de pomme de terre	250g
Glucose	10g
Agar agar	15g
Acidifié à PH = 4.5	

- **Antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés sont choisis en fonction de la disponibilité et de la sensibilité des souches à tester :

- * Céfotaxime : pour *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumonia*
- * Imipénème : pour *Pseudomonas aeruginosa*
- * Vancomycine : pour *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*

Annexe 2

- **Médicaments**

- * Ranitidine (Azantac ®)

C'est un médicament qui inhibe la sécrétion gastrique en bloquant l'effet de l'histamine sur les récepteurs H₂; en diminuant la sécrétion d'acide chlorhydrique et de pepsine, il favorise la cicatrisation des ulcères gastro- duodénaux et prévient les rechutes. C'est un antiulcéreux – antisécrétoires – antihistaminiques (Fattorusso, 2001).

- *Banéocin ®

C'est une pommade cicatrisante et antibactérienne. Elle est formée d'une association d'antibiotiques d'usage exclusivement local contenant deux substances antibactériennes douées d'une puissante activité locale "bactéricide".

Elle est utilisée comme traitement après les grandes ou les petites interventions chirurgicales (Fattorusso, 2001).

- *Phénylbutazone

C'est un anti- inflammatoire non stéroïdien (AINS) du groupe Pyrazolés. Il est caractérisé par une absorption rapide et complète par la muqueuse gastrique, ce qui lui confère une bonne biodisponibilité.

Le Phénylbutazone est indiquée dans le traitement des symptômes de courte durée (moins que 17 jours) des poussées aiguës de rhumatismes abarticulaires, et aussi pour le traitement symptomatique de certains rhumatismes inflammatoires chroniques.

Le Phénylbutazone possède également une toxicité qui se manifeste par des effets secondaires gastro-intestinales (fréquemment les nausées, vomissement, gastrite,...et occasionnellement: ulcère de l'œsophage, ulcère duodéal ou gastrique...), des effets cardio- vasculaires, hématologiques.... (Jacquot C, 1989).

Annexe 3

Techniques histologiques

La confection de coupes histologiques permet l'observation des tissus au microscope photonique après une coloration spécifique. Elles comportent plusieurs étapes. (Gabe, 1968).

1. Fixation: étape primordiale, elle permet d'immobiliser et conserver les structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible du vivant. L'agent fixateur solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le hyaloplasme et les organites.

Les prélèvements sont plongés dans un volume de fixateur F.A.A (formaldehyde/ acide acétique/ alcool éthylique 1/1/8), pendant 4 heures. Après fixation, les organes subissent un lavage à l'eau courante renouvelée plusieurs fois pendant 24 heures, puis transférés dans un liquide conservateur (alcool 70°) jusqu'à l'étape suivante. Chaque pièce est accompagnée d'une étiquette portant toutes les indications utiles (nature et numéro de prélèvement, la date de l'intervention....).

2. Inclusion

2.1. Déshydratation: l'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (7 bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu (70°-75°-80°-85°-90°-95°-100°) 1heure pour chaque bain, la paraffine étant insoluble dans l'eau et soluble dans les hydrocarbures benzéniques benzène, toluène ou xylène.

2.2. Désalcoolisation et éclaircissement: comme l'alcool ne dissout pas la paraffine, on est contraint de le remplacer par un liquide intermédiaire soluble à la fois dans l'alcool et dans la paraffine.

L'immersion, pendant 1 heure dans 2 bains successifs de xylène, chasse l'alcool, dissout les graisses et rend la pièce transparente ou translucide d'où le nom d'éclaircissement donné à cette opération.

2.3. Pénétration des pièces par la paraffine: cette étape consiste à éliminer le xylène et à le remplacer par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains d'une durée de 3 heures chacun à l'étuve à 56°C

2.4. Confection des blocs de paraffine: dans cette étape, ont été utilisés des moules de métal (tissus-TEK111) et des cassettes en plastique sur lesquelles sont inscrites les indications de la

pièce traitée. La paraffine fondue est versée dans les moules légèrement préchauffés à 45°C. La pièce à inclure est orientée et disposée dans la paraffine; on dépose ensuite la cassette correspondante, sur le moule. Le bloc est refroidi rapidement sur une plaque réfrigérée. Environ 15 min plus tard, le bloc a complètement durci. Détaché du moule, il est prêt à être débité au microtome selon l'épaisseur désirée.

3. Confection et étalement des coupes: après installation du bloc sur le microtome, le rabotage commence en ajustant l'échelle à 20 ou 15 μm . Lorsque la pièce apparaît dans le plan de coupe, on ramène l'échelle à 4 μm pour obtenir des coupes fines sous forme de rubans. Cette dernière est déposée sur une surface d'eau distillée chauffée à 37°C. La paraffine se ramollit brusquement. A l'aide d'aiguilles à dissection, les coupes sont déposées et collées sur les lames puis séchées à 60°C dans une étuve. A l'aide d'un diamant, les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante.

4. Coloration: la coloration joue un rôle important car elle différencie les parties élémentaires de la cellule tels que: noyau, cytoplasme, fibre...et comporte les étapes suivantes:

- 1) Le déparaffinage: 3 bains de xylène 5 min chacun.
- 2) La réhydratation: 3 bains d'éthanol (100°-95°-80°) + un lavage à l'eau courante
- 3) La coloration:
 - a) Hématoxyline de Harris (3 min) + un lavage à l'eau courante.
 - b) Eosine (3min) + un lavage à l'eau courante.
- 4) La déshydratation: 3 bains d'éthanol (80°-95°-100°)

Résultats:

Hématoxyline de Harris colore les noyaux cellulaires qui apparaissent en bleu violet.

Eosine colore la plupart des composants cytoplasmiques en rose rouge.

5. Montage : le montage est l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une substance appropriée (Eukit) au colorant utilisé, une lamelle de verre sur l'échantillon histologique.

Les lames sont ensuite séchées dans l'étuve à 35°C, nettoyées au xylène et enfin observées au microscope photonique.

6. Photos: Les photographies figurant dans ce mémoire ont été prises à l'aide d'un appareil photos numérique fixé sur microscope.

Annexe 4

Nous avons présenté ici le calcul des doses des produits administrés pour le test ulcéreux et le test anti-ulcéreux (la Phénylbutazone, la Ranitidine et le décocté de la plante *Inula viscosa* (L.)).

Remarque : Le calcul des différentes doses se fait quotidiennement après avoir le poids moyen des rats de chaque lot.

• Préparation des solutions

1. Préparation des solutions d'*Inula viscosa* à 500 mg/kg/j et à 250mg/kg/j (à partir de la solution mère)

1. la dose de 500 mg/kg/j

$$\begin{array}{l} 500 \text{ mg} \rightarrow 1000\text{g} \\ X \quad \rightarrow 198.6\text{g} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 500 \text{ mg} \rightarrow 1000\text{g} \\ X \quad \rightarrow 198.6\text{g} \end{array}} \right\} X=99.3\text{mg}$$

$$\begin{array}{l} 99.3\text{mg} \rightarrow 2\text{ml} \\ Y \quad \rightarrow 20\text{ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 99.3\text{mg} \rightarrow 2\text{ml} \\ Y \quad \rightarrow 20\text{ml} \end{array}} \right\} Y= 993\text{mg}$$

$$\begin{array}{l} 2500\text{mg} \rightarrow 40\text{ml} \\ 993\text{mg} \rightarrow Z \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 2500\text{mg} \rightarrow 40\text{ml} \\ 993\text{mg} \rightarrow Z \end{array}} \right\} Z= 1.58\text{ml}$$

1.58ml de la solution mère ajustée à 20 ml d'eau distillée

2. la dose de 250 mg/kg/j

$$\begin{array}{l} 250 \text{ mg} \rightarrow 1000\text{g} \\ X \quad \rightarrow 194.4\text{g} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 250 \text{ mg} \rightarrow 1000\text{g} \\ X \quad \rightarrow 194.4\text{g} \end{array}} \right\} X= 48.6\text{mg}$$

$$\begin{array}{l} 48.6\text{mg} \rightarrow 2\text{ml} \\ Y \quad \rightarrow 20\text{ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 48.6\text{mg} \rightarrow 2\text{ml} \\ Y \quad \rightarrow 20\text{ml} \end{array}} \right\} Y= 486\text{mg}$$

$$\begin{array}{l} 2500 \text{ mg} \rightarrow 40\text{ml} \\ 486 \text{ mg} \rightarrow Z \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 2500 \text{ mg} \rightarrow 40\text{ml} \\ 486 \text{ mg} \rightarrow Z \end{array}} \right\} Z= 0.77\text{ml}$$

0.77ml de la solution mère ajustée à 20 ml d'eau distillée.

2. Solution à la Phénylbutazone (PBZ)

Le poids corporel moyen des rats est égal à 191.9 g

La dose de la PBZ= 200 mg/kg/j.

$$\left. \begin{array}{l} 200 \text{ mg} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ X \quad \rightarrow 191.9 \text{ g} \end{array} \right\} X = 38.38 \text{ mg/kg/j.}$$

Chaque rat reçoit 38.38mg de la PBZ distribuée dans 2 ml d'eau distillée.

Préparation

Mettre la matière première de la PBZ dans un mortier préalablement lavé et séché. Broyer la PBZ a pour but d'affiner les particules. Diluer la PBZ dans de l'eau distillée avec quelque gouttes de Tween 80 à 1% afin de dissoudre les molécules de cette dernière qui est liposoluble et d'obtenir une solution homogène.

3. Solution de la Ranitidine :

La dose thérapeutique est de 5 mg/kg/j.

Le poids moyen des rats pour le premier jour est 199 g.

X est la dose utilisée.

$$\left. \begin{array}{l} 5 \text{ mg} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ Y \quad \rightarrow 199 \text{ g} \end{array} \right\} Y = 0.995 \text{ mg/rat/j.}$$

$$\left. \begin{array}{l} 0.995 \text{ mg} \rightarrow 2 \text{ ml} \\ 150 \text{ mg} \rightarrow Z \end{array} \right\} Z = 301.5 \text{ ml.}$$

Donc on a dilué 1 comprimé de AZANTAC® dans 301.5 ml d'eau distillée.

Préparation

Mettre un comprimé de la Ranitidine dans un mortier lavé et séché. Broyer le comprimé jusqu'à obtention d'une poudre. Diluer la poudre dans de l'eau distillée pour obtenir une solution homogène.

Remarque: Ces calculs sont pour le premier jour seulement. Pour les autres jours il suffit de remplacer le poids moyen des rats et de procéder de la même manière.

Annexe 5**Résultats de la CLHP**

Aglycones libres (365 nm).

Area	Height	RetentionTime
75180	1582	1.217
5214	167	1.975
127405	3629	3.267
220838	8345	3.808
8387683	202635	7.242
13199	50	13.458
12473	138	15.650
65499	510	18.75
3047	69	22.483
8827	87	25.55
34361	351	29.817
12759	169	31.75
315745	2269	36.00
304548	15248	37.00
15225	25415	38.8
154782	74687	39.00
26185283	1463325	39.650
4545424	458462	40.00
77964060	2088133	40.683
4571736	215322	42.175
4705096	159645	43.933
7595505	180115	44.492
27550	638	48.350
13782	102	50.908

Acides phénols (260 nm).

Area	Height	Retention Time
59709500	2068747	2.975
56682015	1651660	3.617
104618761	2265595	4.492
71888059	2039985	5.142
83921113	1120111	5.950
560039	7718	16.817
12583485	880716	40.167
9644716	594511	40.558
4625301	187280	42.225
25630	1939	43.142
10750	1035	43.558
1215921	66414	44.283
1655915	85011	44.892
86401	1473	48.45
12095	255	50.217

Hétérosides flavoniques (370 nm).

Area	Height	Retention Time
40477	2622	2.958
127577	5840	3.275
5945552	162984	5.850
11805362	474725	7.433
191562	19735	8.375
19407812	1196344	8.775
3172831	244767	9.425
11596836	818753	9.65
3901998	186778	10.933
19762	1661	11.908
1079985	53054	12.475
2188135	118374	12.975
8613	485	14.275
1279752	9931	15.242
3723	56	18.233
28852	1374	19.900
866177	14656	21.217
2031	72	29.883
36417	443	45.067

C- glycosides (370 nm).

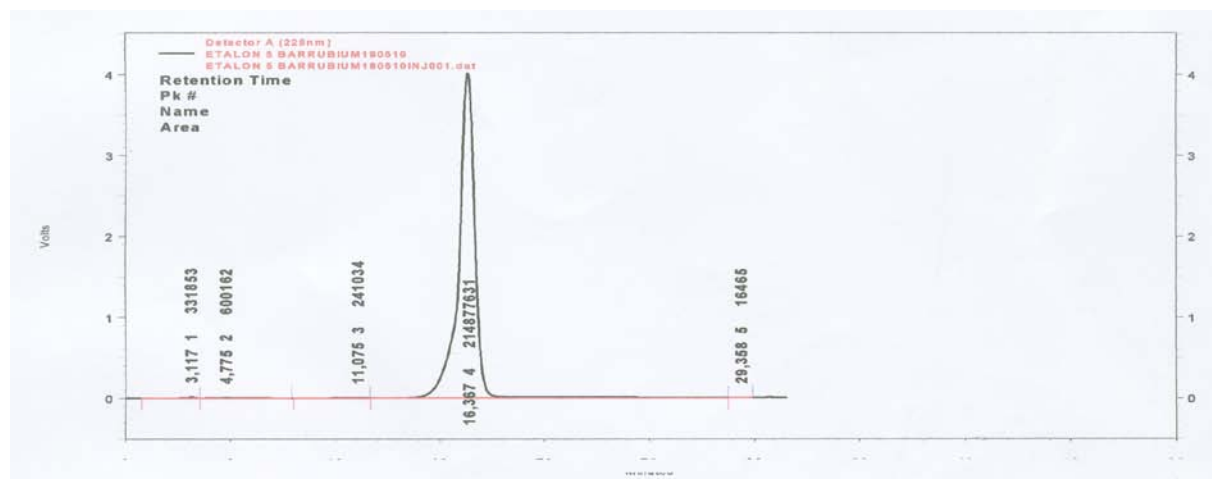
Area	Height	Retention Time
170214	13831	2.817
4648735	303215	3.167
25.2910	186708	3.867
18129212	514640	7.283
16371892	492373	7.758
1426781	63164	8.783
93657	3675	11.375
63403	2605	12.808
192976	6182	13.550
243488	3896	14.300
182830	6150	15.292
507545	10568	16.133
1909562	44414	17.258
883602	20494	17.933
1686979	35507	19.125
4394734	50266	20.575
188801	1915	23.300

Aglycones (Flavones - Flavanols) (365 nm).

Area	Height	Retention Time
11421	373	2.883
119144	5519	3.608
1101852	36497	6.358
1349819	37652	7.250
1446174	43461	7.717
1236957	15948	9.517
30095	429	13.992
968184	6494	20.392
23389	256	27.092
459617	2166	34.775
31726962	1817322	38.383
38138495	2053731	38.633
50487740	1915503	38.950
13062204	654998	39.608
51918377	1957617	40.283
47269480	2091152	41.108
52607845	1924157	41.425
2316889	178938	42.542
15345170	369246	43.075
5280863	123890	43.900
145784	414585	45.100
446574	4584	45.692

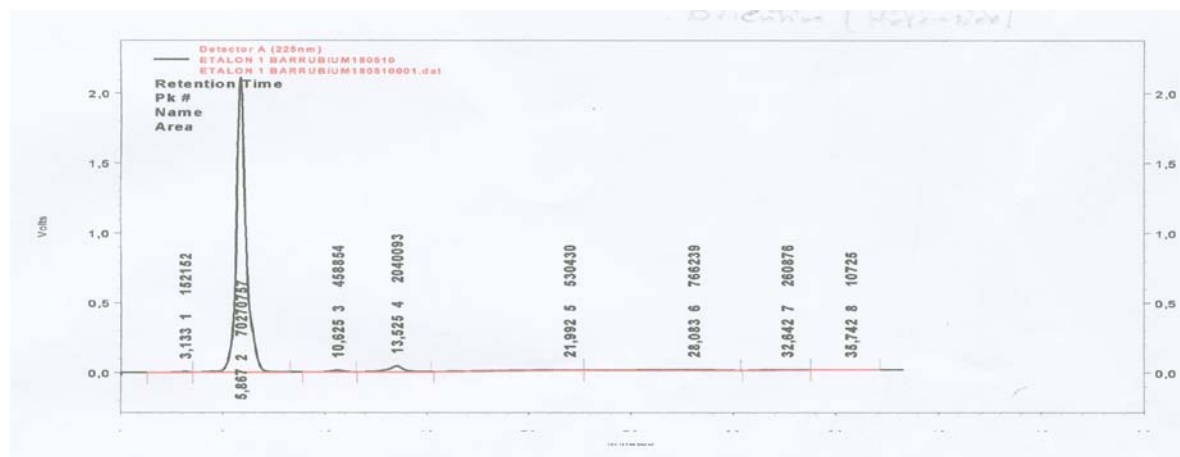
Profils des étalons utilisés dans l' C.L.H.P

*Iso-vitexine



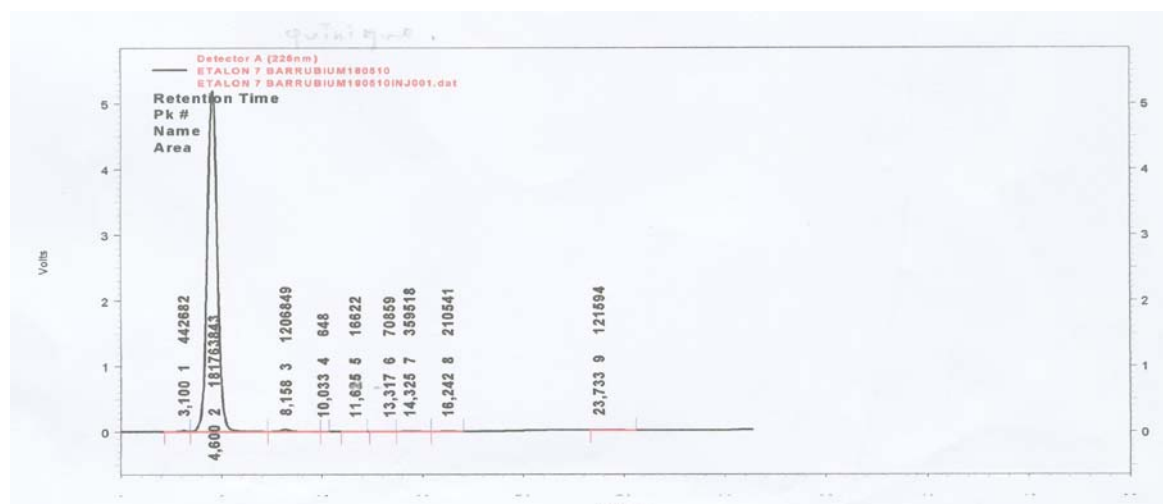
Area	Height	Retention Time
331853	14722	3.117
600162	6960	4.775
241034	2750	11.075
214877631	4000451	16.3674
16465	424	29.358

*Orientine



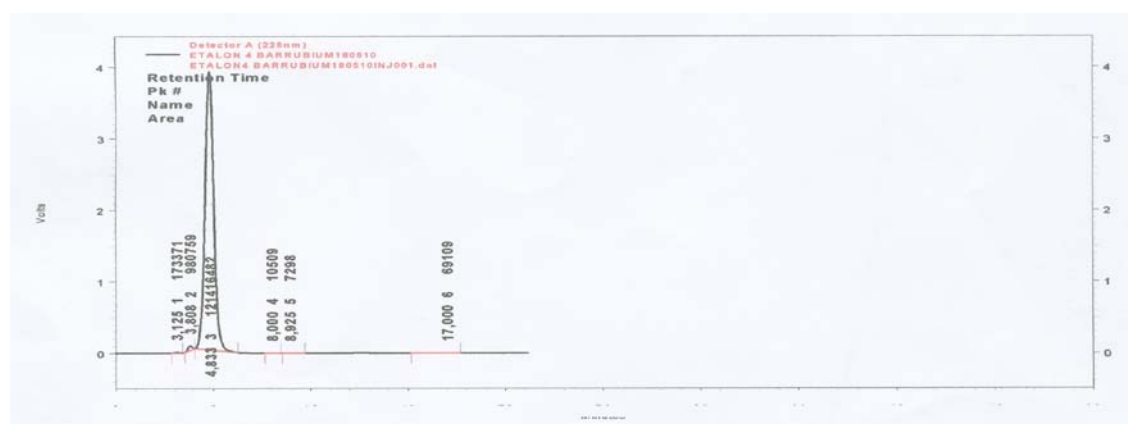
Area	Height	Retention Time
152152	5753	3.133
70270757	2107451	5.867
458854	11356	10.625
2040093	40254	13.525
530430	1370	21.992
766239	2683	28.083
260876	1320	32.642
10725	162	35.742

*Acide dicaféoyl 4-5 quinique



Area	Height	Retention Time
442682	19172	3.1001
181763843	5193199	4.6002
1206849	34528	8.1583
648	30	10.0334
16622	487	11.6255
70859	1725	13.3176
359518	7765	14.3257
210541	2772	16.2428
121594	1394	23.7339

*Acide chlorogénique



Area	Height	Retention Time
173371	10850	3.1251
980759	63430	3.808
121416482	2802516	4.822
10509	196	8.925
69109	619	17.000

Annexe 6

Les surfaces des plaies traitées, et témoins sont représentées dans les tableaux suivants.

Tableau N°1 : surface des plaies traitées par la pommade de *Inula viscosa*.

Nombre de souris	Surface des plaies en cm ² : <i>Inula viscosa</i>					
	J0	J4	J7	J9	J11	J14
souris 1	1,84	1,7	1,56	1,4	1,07	0,18
souris 2	1,64	2,03	1,41	0,65	0,5	0
souris 3	2,24	1,81	1,87	1,73	1,26	0,96
souris 4	2,15	1,73	1,46	1,4	0,87	0,23
souris 5	2,17	1,51	1,62	1,07	0,79	0,31
souris 6	2,05	1,71	1,22	1,57	0,02	0
souris 7	2,1	1,98	1,94	1,52	1,46	0,26

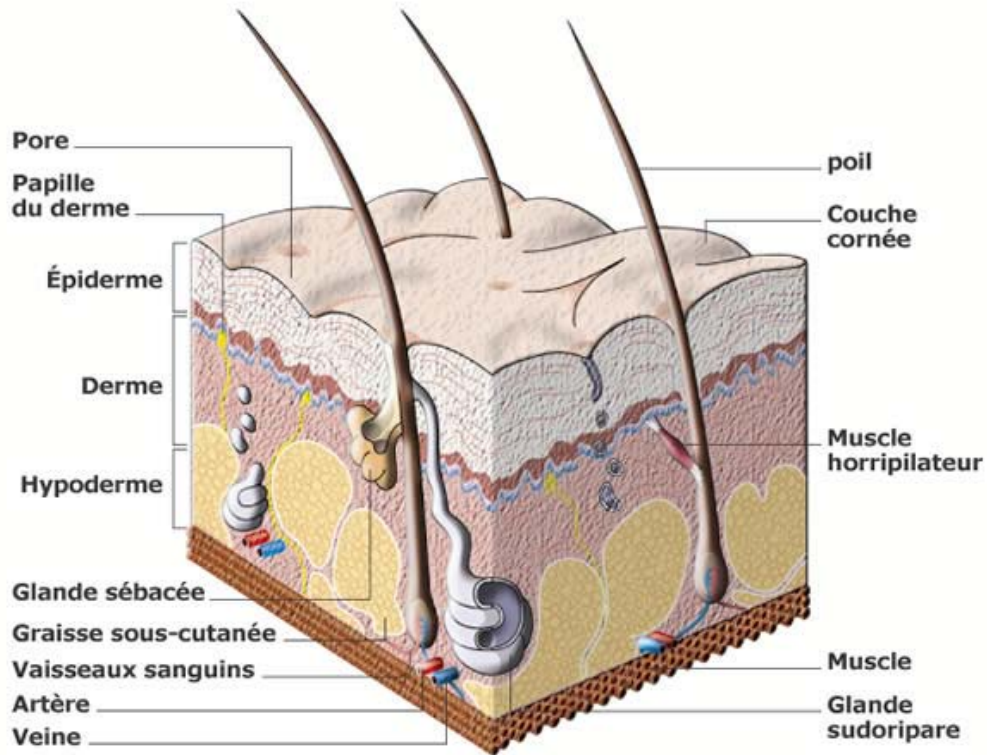
Tableau N°2 : surface des plaies traitées par la pommade de référence "Baneocin®".

Nombre de souris	Surface des plaies en cm ² : Baneocin®					
	J0	J4	J7	J9	J11	J14
souris 1	2,1	1,99	0,94	0,48	0,27	0
souris 2	1,74	1,93	1,53	0,74	0,54	0,26
souris 3	2,05	2,21	1,56	0,88	0,64	0,28
souris 4	1,6	1,28	1,01	0,46	0,47	0,28
souris 5	1,8	1,58	1,47	1,03	0,86	0,28
souris 6	1,6	1,45	1,1	1,05	0,53	0,19
souris 7	1,9	1,43	1,29	1,09	0,72	0,18
souris 8	1,6	1,42	0,74	0,41	0,4	0
souris 9	1,8	1,9	1,2	0,99	0,5	0,2

Tableau N°3 : surface des plaies non traitées.

Nombre de souris	Surface des plaies en cm ² :Témoin					
	J0	J4	J7	J9	J11	J14
souris 1	1,63	1,07	1,1	0,82	0,42	0,24
souris 2	1,68	1,15	0,83	0,54	0,65	0,56
souris 3	1,99	1,26	1,03	0,49	0,5	0,4
souris 4	1,97	1,04	0,7	0,36	0,62	0,31
souris 5	1,84	0,98	0,79	0,41	0,55	0
souris 6	1,79	1,13	0,91	0,68	0,53	0,22
souris 7	1,99	0,96	0,76	0,38	0,26	0,12
souris 8	1,79	0,96	0,53	0,29	0,2	0,07

Annexe 7



La peau (Meaume et Dereure, 2001).

Annexe 8

ANOVA

Le test idoine pour comparer la cotation des ulcères est le test ANOVA à un facteur $p=5\%$.
"Comparaison entre 4 colonnes"

Traitement	Extrait flavonique	Décocté à dose de 500mg	Décocté à dose de 250mg	Ranitidine	total
cotation	0	1	2	1	
	0	0	1	0	
	2	0	0	0	
	1	0	0	0	
	0	1	1	0	
	0	1	1	2	
	0	1	1	2	
T_i	3	4	6	5	$T_G=18$
T_i^2/n_i	1.29	2.28	5.14	3.57	$\sum T_i^2/n_i=12.28$
$X= T_i/n_i$	0.42	0.57	0.85	0.71	
$\sum X^2$	5	4	8	9	26

N: nombre total de valeur=28.

P: nombre de colonne= 4.

T_i : somme des cotations de chaque colonne.

n_i : nombre de rats de chaque lot =7.

T_G : somme des T_i .

\bar{X} : la moyenne d'ulcère.

F cal = A/B si $B < A$.

F cal = B / A si $B > A$.

F cal est comparé à F tab $\left\{ \begin{array}{l} P-1 \\ N-P \end{array} \right.$ selon table de fisher.

Avec:

$$A = \frac{\sum(T_i^2/n_i) - T_G^2/N}{P-1} = 3.88$$

$$B = \frac{\sum x^2 - \sum(T_i^2/n_i)}{N-P} = 0.57$$

$$F_{\text{cal}} = A/B = 6.8$$

$$F_{\text{tab}} \left\{ \begin{array}{l} P-1=3 \\ N-P=24 \end{array} \right. \text{ selon table de Fisher} = 3.01$$

$F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}} \Rightarrow H_0$ est rejetée

Donc: existe une différence significative entre les 4 colonnes.

ملخص

يمثل هذا العمل مشاركة في دراسة المركبات الفينولية المتواجدة في أوراق المقرمان التي تنتمي إلى عائلة الأستراسيا. قد تم اختيار هذه النبتة لما لها من منافع علاجية و لقدرتها على منع التأكسد.

تم استخراج المركبات الفينولية بمختلف المذيبات (القطبية و اللاقطبية) و سمح لنا ذلك بالتقدير الكمي للمستخلصات الفينولية لكل عينة باستعمال أشعة الطيف فوق البنفسجية المرئية : فلافون- فلافونول : 0.71مغ. غ⁻¹ ± 0.23، الفلافوغلووسيدات الكربونية : 0.41مغ. غ⁻¹ ± 0.13، الفلافونات الحرة (غير مرتبطة بسكر) : 0.62مغ. غ⁻¹ ± 0.19، الفلافوغلووسيدات 1.73مغ. غ⁻¹ ± 0.54.

و بمعرفة تركيب كل مستخلص فينولي والكشف عن مكوناته باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا على صفائح رقيقة و على الورق و الكروماتوغرافيا السائلة الفائقة الأداء: 5 فلافون ، 5 فلافونول ، 4 أحماض فينولية تنتمي إلى السلسلة السين امية ، 11 فلافوغلووسيدات الكربونية و 9 فلافوغلووسيدات الاكسجينية، لم يتم الكشف عن أي انتوسيان في هذه المستخلصات.

نتائج البحث عن التنوع الحيوي الفينولي داخل النوع النباتي، اوضحت أن العينات المدروسة موزعة إلى 4 أنواع كيميائية مختلفة و هذا الذي ربما يسمح بالقول انه يوجد نسيخ في هذا النوع: اينولا

الاختبارات الميكروبيولوجية و الفرماكولوجية أظهرت أن المركبات الفينولية لنبتة المقرمان تتمتع بنشاط ضد البكتيريا و الفطريات و الخمائر، و أثبتت كذلك إزالة الجروح و التئام أثارها الناتجة عن بتر أو استئصال عند الفار. ان فعاليته ضد التقرحات المعدية ناتجة عن المركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية : المقرمان، المركبات الفينولية، التنوع للمركبات الفينولية، النشاط ضد البكتيريا، الخمائر و الفطريات، التئام الجروح، الفعالية ضد التقرحات المعدية.

Abstract

This work is a contribution to study phenolic compounds of the leaves of *Inula viscosa* (L.), the family Asteraceae, are chosen for here therapeutic effect and its high antioxidant capacity. The extraction of large families of polyphenols in different solvent (polar and apolar), has allowed us to:

- quantify by UV-visible spectrophotometer the following compounds (flavonols- flavones : 0.71 mg/g ± 0.23, C-glycosides: 0.41 mg/g ± 0.13, aglycones free : 0.62 mg/g ± 0.19, and glycosides: 1.73 mg/g ± 0.54).
- revealed and identified by thin layer chromatography (T.L.C) and paper (C.P) and high performance liquid chromatography (H.P.L.C), the phenolic composition of each family : 5 flavones, 5 flavonols, 2 flavanonols, 6 phenolic acids of cinnamic series, 11 C-glycosides and 9 O-glycosides. No anthocyanin has been revealed.

The research results of the intraspecific biodiversity showed that the individuals studied are divided into four distinct chemotypes that denote a possible presence of clones in the species *Inula viscosa* (L.).

Microbiological and pharmacological tests showed that: the phenolic compounds of *Inula viscosa* (L.) have antibacterial and antifungal activities, a healing power on the wounds of circumcision. The antiulcerogenic effect is attributed to flavonic compounds.

Key words: *Inula viscosa* (L), phenolic compounds, phenolic diversity, anti-bacterial and antifungal activities, wound healing, antiulcer gastro-duodenom (gastric).