



## *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu de nous avoir aidé et donné le courage, la volonté et le savoir pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous voudrions en premier lieu remercier profondément, notre chère promotrice Madame AYATI Fadila, enseignante. De nous avoir aidée et guidée tout au long de ce travail, pour sa patience, sa compétence, sa gentillesse, sa disponibilité malgré toutes ses préoccupations, et ses judicieux conseils qui ont permis d'accomplir à bon terme cette étude. Merci Madame pour votre optimisme, votre confiance et encore pour votre disponibilité.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Nous tenons également à remercier chaleureusement Monsieur Hammî. S, notre Co-promoteur, Ingénieur en R & D à Saïda. Qui a partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu. De nous avoir soutenus dans chaque étape, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses précieux conseils, qui ont contribué en grande partie à alimenter nos réflexions.*

*Nous adressons aussi tous nos remerciements à Madame DAHMANI Nacera, pour sa disposition, de nous avoir ouvert les portes à USTHB, pour accomplir notre travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, Madame BEKDA Hamida, qui nous fait l'honneur de présider ce jury, Madame IDRIS Imane, pour avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs remarques et critiques.*

*Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire de chimie de surface, d'organique et pharmaceutique, particulièrement Madame BELKADI, d'être présente à nos côtés, de nous avoir prises en charge. Merci à Syla, Houria, et Djedjigua, qui nous ont permis d'assurer la pratique de ce*

*mémoire. Sans oublier nos professeurs de la faculté de chimie, Monsieur MAMOU. M et Monsieur ELIAS.*

*Monsieur HOUALI. K, à qui nous adressons encore une fois de plus, nos sincères remerciements, de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire au Département des Sciences Agronomiques de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomique à UMMTO. Pour sa modestie, son encouragement et son soutien qu'il nous a accordé pour assurer la partie pratique. Sans oublier Monsieur Kadi, Monsieur BARIZ. K et Madame HACID.F.*

*Au final, Nos sincères remerciements vont aussi à tous ce qui ont contribué de près ou du loin pour ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour à tous ceux qui me sont cher(e)s :*

*À la mémoire de mon cher père et mon deuxième père (vava Salem), que dieu vous accueille dans son vaste paradis inchallah*

*À ma chère mère pour tout son sacrifice, son affection et son amour, pour mon éducation, pour son soutien et encouragement en toutes situations, leurs présences et leurs conseils en toutes circonstances et leurs engagements total pour notre réussite, moi et mes deux sœurs*

*À mes chères sœurs (Lynda et Sissa) et mon chéri pour leurs présences, soutiens et leurs encouragements tout au long de mes études*

*À ma chère copine, binôme Saloua Ça a été un plaisir de travailler avec toi. Ça a été un réconfort de t'avoir à mes côtés à chaque étape qui nous séparait de notre projet.*

*Je dédie ce travail également à mes tantes (Tasadith, Sadia) qui ont joué un rôle important lors de la récolte de la plante, et à toute la famille de près ou de loin, à mes amis (es) et mes camarades.*

*Katia*

## *Dédicaces*

*Avec un énorme plaisir, immense joie et profond amour que, Je dédie ce modeste travail :*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuses, à celle qui m'a arrosée de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour incessible, à la mère des sentiments fragiles qui me bénie par ses prières, Salîha ma chère mère.  
À mon support dans ma vie, Youcef mon cher père.*

*Pour leurs patiences illimitées, leurs amours, leurs soutiens, leurs encouragements et leurs grands sacrifices ainsi que les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être.*

*Vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection.*

*C'est à vous que je dois cette réussite, puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.*

*À ma tendre sœur chérie Farîda, qui est toujours à mes côtés, qui ne cesse à aucun moment de me conseiller, encourager et soutenir dans ma vie et tout au long de mes études. À son mari Jugurtha, pour ses encouragements.*

*À leurs filles, mes petites nièces chéries, Dana et Nélya.*

*À mon cher grand frère Tahar et ma chère belle-sœur Manal, pour leur amour, aides et encouragements. À leur fils, mon cher petit neveu Mattias.*

*À mon adorable cher frère Hamouche, pour sa tendresse, soutiens et encouragements pour aller toujours de l'avant.*

*Malgré que vous êtes loin de nous, mais toujours dans nos cœurs et pensées, que Dieu vous bénisse.*

*À tous ceux qui me sont chers.*

*À ma très chère copine et binôme Katia CHABOUNI, ce fut un énorme plaisir de t'avoir rencontrée, merci d'avoir partagé ce modeste travail avec moi et d'avoir supporté mes humeurs, je te souhaite beaucoup de réussites dans ta vie, que Dieu illumine ton chemin.*

*À mes Amies et aux personnes qui ont contribué de près ou de loin, Lylia ZIANI, Ouïza SAMAH, Hadjer Ouerden, Melissa.*

*Saloua*

## Liste des figures

<b>Fig.1.1</b> : Image représentant les différentes formes <i>d'Inula Viscosa</i> .....	3
<b>Fig.1.2</b> : Structures chimiques des molécules phénoliques <i>d'inule visqueuse</i> .....	5
<b>Fig.1.3</b> : Structures chimiques de quatre molécules phénoliques identifiées dans l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> .....	6
<b>Fig.1.4</b> : Schéma du montage de l'hydrodistillation .....	7
<b>Fig.2.1</b> : Photo de la plante <i>Inula Viscosa</i> .....	13
<b>Fig.2.2</b> : Photo du séchage <i>d'Inula Viscosa</i> .....	13
<b>Fig.2.3</b> : Situation géographique du site de collecte <i>d'Inula Viscosa</i> .....	14
<b>Fig.2.4</b> : Photo du montage expérimental.....	15
<b>Fig.2.5</b> : Schéma de la distillation sous-vide.....	21
<b>Fig.2.6</b> : Réactions d'estérification de l'acide Acétylsalicylique.....	25
<b>Fig.2.7</b> : Etapes de la synthèse du menthol.....	26
<b>Fig.2.8</b> : Préparation de l'inoculum.....	28
<b>Fig.3.1</b> : Teneur en eau et en matière sèche (MS) <i>d'Inula Viscosa</i> des deux régions.....	30
<b>Fig.3.2</b> : Rendements d'extraction de l'HE <i>d'I. Viscosa</i> des deux régions.....	30
<b>Fig.3.3</b> : HE <i>d'Inula Viscosa</i> .....	31
<b>Fig.3.4</b> : Structure chimique du Caryophyllene oxide.....	37
<b>Fig.3.5</b> : Rendements des extraits polyphénols <i>d'I. Viscosa</i> par le méthanol et l'éthanol pour les deux régions.....	41
<b>Fig.3.6</b> : Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles <i>d'Inula</i> <i>Viscosa</i> (Iferhounene).....	43
<b>Fig.3.7</b> : Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles <i>d'Inula</i> <i>Viscosa</i> (Ouahias).....	44
<b>Fig. A (1).1</b> : Réfractomètre d'Abbe classique.	
<b>Fig. A (2).1</b> : Chromatogrammes de l'analyse de l'HE des feuilles <i>d'Inula Viscosa</i> .	
<b>Fig. A (3).1</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-méthanoïque des deux régions.	
<b>Fig. A (3).2</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-éthanolique des deux régions.	
<b>Fig. A (3).3</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles <i>d'Inula Viscosa</i> .	
<b>Fig. A (4).1</b> : Appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance.	

**Fig. A (4).2 :** Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles *d'Inula Viscosa* :  
Solutions standards.

**Fig. A (5).1 :** Préparation des crèmes pharmaceutiques.

**Fig. A (5).2 :** Test de la goutte pour la crème pharmaceutique.

**Fig. A (5).3 :** Test de centrifugation pour les crèmes formulées.

**Fig. A (5).4 :** Microscope photonique.

**Fig. A (5).5 :** Examen microscopique.

**Fig. A (6).1 :** Lecture après 24h après incubation pour les deux tests.

## Liste des tableaux

<b>Tableau.1.1</b> : Différentes appellations de la plante.....	2
<b>Tableau.1.2</b> : Position systématique de <i>l'inule visqueuse</i> .....	4
<b>Tableau.2.1</b> : Matériel de laboratoire utilisé durant le travail.....	12
<b>Tableau.2.2</b> : Coordonnées géographiques des lieux de récolte.....	14
<b>Tableau 2.3</b> : Conditions opératoires de l'analyse par CPG/SM.....	17
<b>Tableau.2.4</b> : Protocoles d'identification phyto-chimique.....	18
<b>Tableau.2.5</b> : Standards et temps de rétentions utilisés pour l'analyse par HPLC.....	22
<b>Tableau.2.6</b> : Composants de la formulation galénique avec leur rôle.....	22
<b>Tableau.2.7</b> : Principales caractéristiques des souches bactériennes testées.....	26
<b>Tableau.3.1</b> : Taux d'humidité des feuilles <i>d'I. Viscosa</i> des deux régions.....	29
<b>Tableau.3.2</b> : Rendements des HEs des feuilles (fraîches, sèches) et de la poudre.....	31
<b>Tableau.3.3</b> : Rendements d'extraction des HEs de <i>l'I. Viscosa</i> . Résultats des travaux antérieurs.....	31
<b>Tableau.3.4</b> : Caractéristiques de la plante <i>I. Viscosa</i> comparées aux normes AFNOR et Pharmacopée Européenne.....	32
<b>Tableau.3.5</b> : Composition de l'HE <i>d'I. Viscosa</i> de la région d'Iferhounene.....	33
<b>Tableau.3.6</b> : Composition de l'HE <i>d'I. Viscosa</i> de la région de Ouadhias.....	35
<b>Tableau.3.7</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-méthanoïque.....	38
<b>Tableau.3.8</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-éthanolique.....	39
<b>Tableau.3.9</b> : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles.....	39
<b>Tableau.3.10</b> : Rendements des extraits polyphénols par différents solvants.....	40
<b>Tableau.3.11</b> : Standard et temps de rétentions utilisés pour l'analyse des polyphénols par HPLC.....	42
<b>Tableau 3.12</b> : Contrôle qualité des crèmes formulées.....	45
<b>Tableau.3.13</b> : Diamètre des zones d'inhibition des différents extraits des feuilles <i>d'Inula Viscosa</i> .....	46
<b>Tableau A.1</b> : Propriétés des réactifs et solvants utilisés.....	Annexe 1
<b>Tableau A.2</b> : Caractéristiques de l'appareillage utilisé.....	Annexe 1

## Liste des abréviations et symboles

**ATB** : Antibiotique

**Bacillus** : Bacillus Subilis

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur-cerveille)

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**D** : Diamètre

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité optique

**DZI** : diamètre de la zone d'inhibition

**E. coli** : *Escherichia-coli*

**EtOH** : Ethanol

**GN** : Gélose nutritiv

**H %** : Taux d'humidité en pourcentage.

**HE** : Huile essentielle

**HEs** : Huiles essentielles

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.

**IR** : Indice de rétention

**MM** : Masse moléculaire

**MeOH** : Méthanol

**MH** : Muller-Hilton

**O.M.S** : Organisation Mondiale de la Santé.

**PA** : Principe actif

**Pseudo** : *Pseudomonas Aeruginosa*

**P/V** : Poids sur volume

**qsp** : Quantité suffisante pour

**SM** : Spectrométrie de masse

**Staph** : *Staphylococcus Aureus*

**T°** : Température

**tr** : Temps de rétention

**µL**: Microlitre

**UV** : Ultra-violet

**V** : Volt

**V/V** : Volume sur volume

# **Sommaire**

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1. Etude ethnobotanique de la plante <i>Inula Viscosa</i> .....	2
1.1.1. Nomenclature.....	2
1.1.2. Description botanique.....	2
1.1.2.1. Partie aérienne.....	2
1.1.2.2. Partie souterraine.....	3
1.1.3. Genre <i>Inula</i> .....	3
1.1.4. Habitat et distribution géographique.....	3
1.1.5. Taxonomie.....	4
1.1.6. Propriétés pharmaceutiques d' <i>Inula Viscosa</i> .....	4
1.1.7. Composition phyto-chimique de la plante.....	4
1.1.7.1. Alcaloïdes.....	5
1.1.7.2. Composés phénoliques.....	5
1.1.7.3. Terpénoïdes (Terpènes).....	5
1.2. Huiles essentielles.....	6
1.2.1. Définition.....	6
1.2.2. Composition chimique d'une huile essentielle.....	6
1.2.3. Facteurs de variabilité.....	6
1.2.4. Méthodes d'obtention des huiles essentielles.....	7
1.2.4.1. Extraction par hydrodistillation.....	7
1.2.5. Toxicité.....	7
1.2.5.1. Toxicité aigüe.....	8
1.2.5.2. Toxicité dermique.....	8
1.2.5.3. Cancérogénicité.....	8
1.2.6. Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles.....	8
1.2.7. Méthode d'analyse des HEs.....	9
1.3. Mise en évidence de la bioactivité d' <i>Inula Viscosa</i> .....	10
1.3.1. Activité antibactérienne des HEs.....	10

1.3.2. Activité antibactérienne des polyphénols.....	10
------------------------------------------------------	----

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

2.1. Matériel.....	12
2.1.1. Matériel de laboratoire.....	12
2.1.2. Matériel végétal.....	13
2.2. Méthodes.....	14
2.2.1. Evaluation du taux d'humidité.....	14
2.2.2. Extraction de l'huile essentielle.....	15
2.2.2.1. Détermination du rendement d'extraction.....	15
2.2.2.2. Propriétés physiques de l'huile essentielle.....	16
2.2.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle.....	16
2.2.2.4. Identification des composés de l'huile essentielle.....	17
2.2.3. Polyphénols.....	17
2.2.3.1. Matière végétale.....	17
2.2.3.2. Screening phyto-chimique.....	17
2.2.3.3. Caractérisation et mise en évidence.....	18
2.2.3.4. Protocole d'extraction des polyphénols.....	20
2.2.3.5. Rendement d'extraction.....	21
2.2.3.6. Analyse qualitative des polyphénols.....	21
2.2.4. Formulation galénique.....	22
2.2.4.1. Composition et préparation des formulations.....	22
2.2.4.2. Contrôle qualité de la formulation pharmaceutique.....	23
2.2.4.2.1. Examens physiques.....	23
2.2.4.2.2. Examen macroscopique.....	23
2.2.4.2.3. Examen microscopique.....	23
2.2.4.2.4. Mesure du pH.....	23
2.2.5. Synthèse du menthol.....	24
2.2.6. Activité biologique : étude de l'activité antibactérienne.....	26
2.2.6.1. Revivification des souches bactériennes.....	27
2.2.6.2. Préparation des pré-cultures.....	27
2.2.6.3. Préparation de la suspension bactérienne.....	27
2.2.6.4. Ensemencement.....	28
2.2.6.5. Préparation des disques.....	28

2.2.6.6. Préparation de l'agent antimicrobien.....	28
2.2.6.7. Dépôt des disques.....	29
2.2.6.8. Lecture.....	29

### **Chapitre 3 : Résultats et discussions**

3.1. Détermination de la teneur en eau.....	30
3.2. Extraction de l'HE <i>d'I. Viscosa</i> .....	31
3.2.1. Rendement de l'HE extraite.....	31
3.2.2. Caractérisation de l'HE <i>d'I. Viscosa</i> .....	33
3.2.2.1. Caractérisation physique et organoleptique.....	33
3.2.2.2. Paramètres physico-chimiques.....	33
3.2.2.3. Identification et analyse de l'huile essentielle par CPG/SM.....	32
3.3. Screening phyto-chimique.....	39
3.3.1. Rendement des extraits.....	41
3.3.2. Analyse qualitative des polyphénols par HPLC.....	42
3.4. Formulation pharmaceutique.....	46
3.4.1. Contrôle qualité des crèmes antiseptiques.....	46
3.5. Etude antibactérienne.....	47

### **Conclusion et perspectives**

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

# **Introduction**

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale en se servant de données ethnobotaniques.

En effet, la médecine traditionnelle s'est toujours basée sur les ressources naturelles, notamment les plantes médicinales, pour traiter beaucoup de maladies. Selon l'OMS, 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se soigner. De nombreux agents pharmaceutiques ont été découverts en criblant des produits naturels à partir des plantes (Sebai et Boudalim, 2012).

La valeur thérapeutique des plantes médicinales réside dans leur richesse en huiles essentielles, huiles végétales et métabolites secondaires. Ces derniers se retrouvent dans une large gamme de plantes qui sont un élément très utile pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments

*Inula Viscosa*, plante médicinale objet de notre étude, espèce méditerranéenne appartenant à la famille des Asteraceae, est l'une des plus vastes familles du monde végétal. Elle est utilisée traditionnellement pour traiter les troubles intestinaux, plaies, maux de têtes, infections pouvant être d'origine bactérienne. Elle est récoltée dans la région kabyle d'Iferhounene et Ouadhias (Centre Est d'Algerie, Tizi-Ouzou).

L'essentiel de notre travail comprend un examen phyto-chimique de la plante permettant de déterminer sa composition qualitative, l'extraction, l'identification, l'étude de la bioactivité des extraits de la plante et enfin, finir avec la réalisation d'une formulation pharmaceutique adéquate à base des extraits. La synthèse chimique du menthol est réalisée pour donner une saveur à notre formulation.

Ce mémoire est réparti en 3 chapitres : Le premier est consacré à la synthèse bibliographique sur la plante *Inula Viscosa*, ses vertus, ses métabolites secondaires, ainsi que les méthodes d'extractions et d'analyse de ces derniers. Dans le deuxième chapitre, nous présentons le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser les manipulations dans leur globalité. Le troisième chapitre traite la discussion et l'interprétation des résultats en les comparant aux résultats des études antérieures. Le mémoire se conclue en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique.

# **Chapitre 1**

## **Synthèse bibliographique**

## 1.1. Etude ethnobotanique de la plante *Inula Viscosa*

### 1.1.1. Nomenclature

Le genre *Dittrichia* est nommé en l'honneur du botaniste allemand Manfred Dittrich, spécialiste des Asteraceae. D'après les recherches de Ciccarelli. D, 2007, *l'inule visqueuse* a été rattachée au genre *Dittrichia* (*Dittrichia viscosa*, L) car elle possède des poils glanduleux sur l'ovaire, ce qui n'est pas le cas des autres plantes du genre *Inula*. Le nom latin du genre *Inula* dériverait du grec *Inéo*, qui signifie « purifier » (allusion à une propriété thérapeutique de la plante), et *viscosa* veut dire : *visqueuse* (Fournier. P, 1947).

Tableau.1.1 : Différentes appellations de la plante.

<b>Nom scientifique</b>	<i>Dittrichia viscosa</i> (L) Greuter, <i>Inula viscosa</i> Ait (Bartels, 1997).
<b>Nom vernaculaire</b>	<i>Amagramane</i> , <i>magramane</i> (Baba Aissa, 2000), <i>Mersitt</i> (Quezel et Santa, 1963).
<b>Nom commun</b>	<i>Inule visqueuse</i> (Bonnier, 1990) ; <i>Aunée visqueuse</i> (Fournier, 1947).
<b>Nom anglais</b>	<i>Sticky fleabane</i> (Halimi A,1997).
<b>Nom français</b>	<i>Inule visqueuse</i> , <i>Aunée visqueuse</i> (Fournier, 1947).
<b>Nom arabe</b>	<i>El tibek</i> , <i>el tyoun</i> ; <i>Terhala</i> (Zeggwagh. A. N et al, 2006).

### 1.1.2. Description botanique

*Inula viscosa* est une plante annuelle, herbacée pérenne ou vivace de la famille des astéracées, odorante, visqueuse et glanduleuse (Bakkara et al, 2008). Elle peut atteindre de 50 cm à 1m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreux au sommet de la tige (Benhammou et Atik Bekkara, 2005).

#### 1.1.2.1. Partie aérienne

**Fleur :** Les fleurs sont rayonnantes, regroupées en inflorescences (capitules) formant de longues grappes de capitules, pyramidales. On les observe en septembre-octobre, parfois jusqu'en novembre (Bonnier, 1990).

**Fruit :** Les fruits sont des akènes (fruits secs) velus, un peu ovoïdes, sont surmontés par une petite aigrette jaunâtre de soies denticulées (Baydar, 1998).

**Feuille :** Les feuilles sont visqueuses, sinuées, ondulées, dentées, aigües, rudes, simples, caduques, opposées, entières, ovales, acuminées de 2 à 3cm de long sur 1 à 1,5cm de large.

**Tige :** La plante *I. Viscosa* est collante et très odoriférante. Ses tiges sont assez ramifiées et pourvues d'un feuillage dense. Avec l'âge, elles deviennent ligneuses et foncées à la base (Quezel et Santa, 1963).

### 1.1.2.2. Partie souterraine

**Racine :** *L'Inule visqueuse* est une plante à racine pivotante, toute glanduleuse-visqueuse, à odeur forte, ligneuse, à sa base c'est une forte racine pivotante lignifiée pouvant atteindre 30 cm de long.



Fig.1.1 : Image représentant les différentes formes *d'Inula Viscosa*  
(a) Fleur, (b) Fruit, (c) Feuille, (d) Racine

### 1.1.3. Genre *Inula*

Le nom *Inula* est très ancien, vient du nom de l'espèce *Inula helenium* et généralisé pour tous les genres. Son genre comprend plus de 90 espèces réparties le plus souvent à travers la région méditerranéenne (Quezel et Santa, 1963). Ce sont des plantes à feuilles alternes, Capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées bractées en plusieurs séries, fleurs périphériques pistillées à ligules tridentées, anthères sagittées à la base (Benguerba, 2008).

### 1.1.4. Habitat et distribution géographique

Le genre *Inula* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France...), Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Algérie, Egypte, Maroc ...) (Quezel et Santa, 1963). Les habitats typiques *d'Inule visqueuse* sont les rivières asséchées et les champs abandonnés, les bords de routes, sentiers de randonnée, ou même des zones urbaines. Elle apparaît aussi sur les sols argileux et sableux (Bensegueni, 2001), les côtes rocheuses ou dans des marécages naturels et autres zones humides, *L'inule visqueuse* se produit également dans des surfaces où les sols ont de hautes concentrations en magnésium et en azote (Parolin et al, 2014).

### 1.1.5. Taxonomie

La position systématique de l'inule visqueuse est comme suite :

Tableau.1.2 : Position systématique de l'inule visqueuse (Quezel et al, 1963., Dupont et al, 2007).

Règne	Végétale
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous Classe	<i>Gamopetales</i>
Ordre	<i>Campunulales</i>
Famille	<i>Compositae ou Astéraceae</i>
Genre	<i>Dittrichia</i>
Espèce	<i>Inula viscosa (L) Ait</i>

### 1.1.6. Propriétés pharmaceutiques d'*Inula Viscosa*

Elle est utilisée pour ses activités : anti-inflammatoires, antidiabétiques (Haoui et al., 2015), antipyrétiques, antiseptiques et son efficacité contre les inflammations cutanées (Hernandez et al, 2005., Khalil et al, 2007., Bakkara et al, 2008).

*L'inule visqueuse* possède une activité antibactérienne, et antifongique. Elle a été utilisée couramment pour prolonger la durée de conservation de nourriture et dans la médecine traditionnelle (Adam. K et al. 1998). Elle est utilisée aussi pour son activité antioxydante, et pour traiter les troubles gastroduodénaux (Al-Dissi et al, 2001) et les troubles intestinaux (Parolin et al, 2014).

*L'inule visqueuse* est réputée être un « insecticide végétal ». (Bouchelta et al, 2005), elle protège l'Olive contre l'attaque des insectes. Ce qui indique bien la relation *Inule-Olivier* connue intuitivement par les anciens (Bssaibis et al, 2009).

### 1.1.7. Composition phyto-chimique de la plante

*L'Inule visqueuse* est une plante riche en métabolites secondaires qui offrent leurs vertus médicinales, parmi ces métabolites on trouve des constituants volatiles : HE et des constituants non volatiles : les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes. Ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (Mouffok, 2011), utilisés en thérapie pour leurs propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires.

### 1.1.7.1. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale contenant au moins un atome d'azote dans la molécule, douée de propriétés physiologiques remarquables (toxique ou thérapeutique), telle que la morphine, caféine, quinine...etc.)

### 1.1.7.2. Composés phénoliques (CP)

Les CP, constituent l'une des plus grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante. Ils possèdent dans leur squelette, un ou plusieurs cycles aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, éther, hétéroside). La structure des CP naturels varie depuis les molécules simples à 6 carbones, telle que les acides phénoliques, flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, vers les molécules hautement polymérisées comme les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes qui se divisent en deux groupes (les tannins hydrolysables et condensés), coumarines, anthocyanes, et d'autres classes existent en nombre considérable (Beta et al, 2005) (Fig.1.2).

### 1.1.7.3. Terpénoïdes (Terpènes)

Ce sont tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecki, 2005). Ils sont présents chez toutes les plantes et possèdent des activités biologiques très diverses.

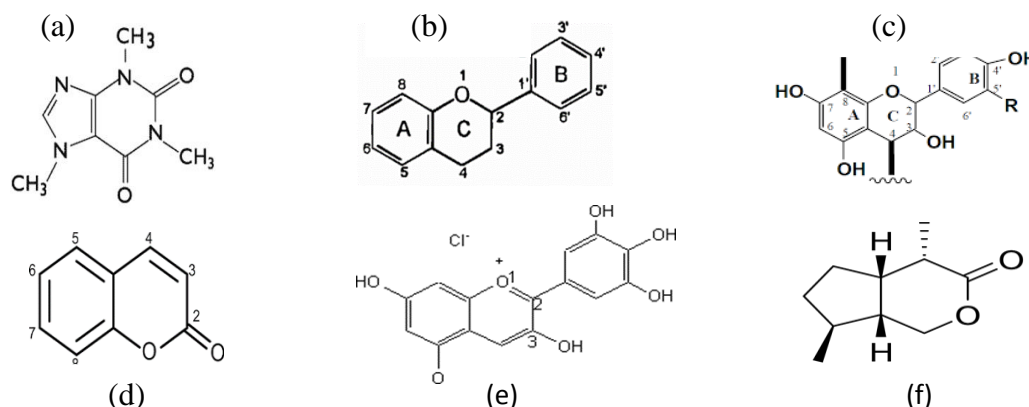


Fig.1.2 : Structures chimiques des molécules phénoliques *d'inule visqueuse* : (a) alcaloïdes, (b) flavonoïdes, (c) tanins, (d) coumarines, (e) anthocyanes, (f) terpénoïdes

## 1.2. Huiles essentielles

### 1.2.1. Définition

Selon la pharmacopée européenne l'HE est un produit odorant, généralement de composition complexe. L'HE se situe généralement dans différentes parties de la plante : dans les fleurs, feuilles, fruits, racines, (AFNOR, 2000). Les applications des HEs dans la vie courante touchent divers domaines en particulier, la cosmétologie, parfumerie et l'industrie agro-alimentaire.

### 1.2.2. Composition chimique d'une huile essentielle

Les HEs peuvent contenir plus d'une centaine de composés aromatiques dans des proportions très variables. Ce sont ces différentes combinaisons de molécules qui donnent des propriétés si particulières aux HEs et qui sont responsables de leur odeur caractéristique. Les composés qu'on trouve majoritairement dans la composition chimique de l'HE sont les terpènes, les alcools, les phénols, des phénols méthyle-éthers, les oxydes, les aldéhydes, les esters, les cétones, les lactones, les coumarines et composés sulfurés (Fig.1.3).

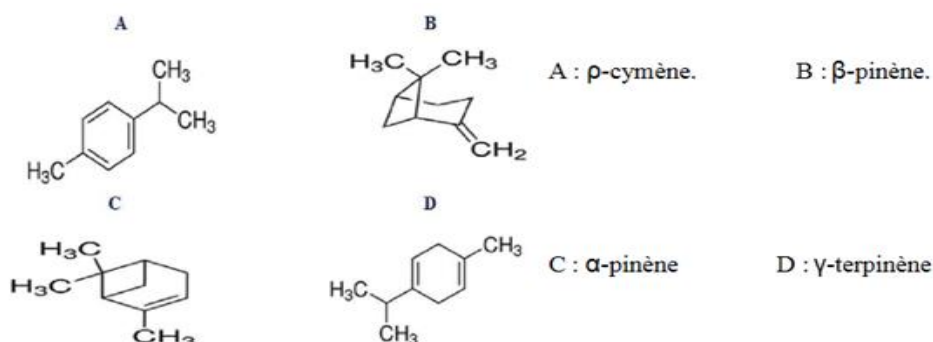


Fig. 1.3 : Structures chimiques de quatre molécules terpéniques identifiées dans l'huile essentielle *d'Inula viscosa* (Bouyahia et al, 2018)

### 1.2.3. Facteurs de variabilité

La variabilité des HEs dépend de facteurs extérieurs auxquels la plante est soumise tout au long de son développement. Parmi ces facteurs, certains sont liés à l'environnement : climat, humidité, altitude, température. D'autres sont liés à l'intervention de l'homme : période de récolte, partie de plant utilisée, séchage, pratiques d'extraction...

### 1.2.4. Méthodes d'obtention des huiles essentielles

En général, le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés à extraire, du rendement en huile et de la fragilité de certains constituants des huiles. Parmi les méthodes d'extraction utilisées : L'hydrodistillation, l'extraction par solvant, l'extraction par entraînement à la vapeur et par un procédé mécanique sans chauffage (AFNOR, 2000).

#### 1.2.4.1. Extraction par hydrodistillation

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle, la non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'HE au cours de la distillation (Chalchat et al, 1997).

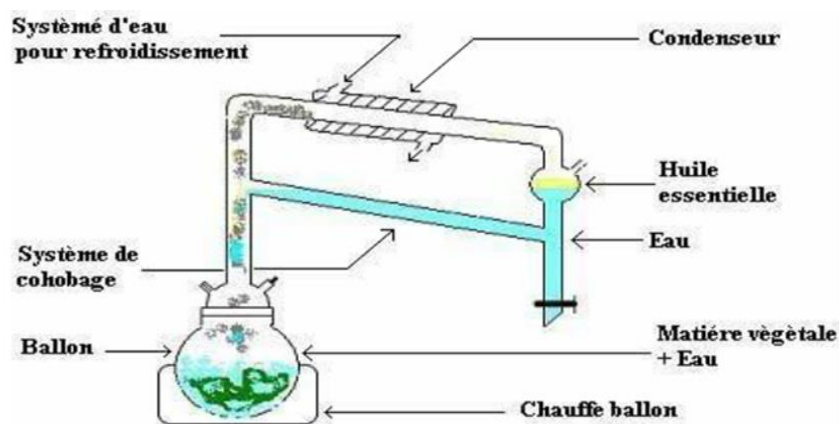


Fig.1.4 : Schéma du montage de l'hydrodistillation (Hernandez Ochoa, 2005).

### 1.2.5. Toxicité

Les HEs ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. En effet elles peuvent être toxiques ou présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les HEs sont des substances très puissantes et très actives, il ne faut donc jamais exagérer dans les doses, quel que soit la voie

d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée (Degryse. A et al, 2008., Englebin. M, 2011).

L'HE peut s'avérer allergisante, photosensibilisante, cytotoxique, irritante, néphrotoxique, hépatotoxique, neurotoxique principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques ...). L'accumulation des essences dans l'organisme par des prises répétées peut conduire à des nausées, des céphalées...

#### **1.2.5.1. Toxicité aigüe**

Les HEs en général, ont une toxicité aigüe par voie orale. La majorité ont une DL<sub>50</sub> comprise entre 2 et 5g /kg (eucalyptus) ou ce qui est le plus fréquent, supérieur à 5g/kg (lavande).

#### **1.2.5.2. Toxicité dermique**

Certaines HEs sont irritantes (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergènes (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou phototoxiques (huiles de citrus contenant des furocoumarines. Il faudra toujours les diluer avec une huile végétale (80%) et les appliquer sur des surfaces corporelles bien localisées (Pierron. C, 2014., Piochon. M, 2008), « toxicité des huiles essentielles ».

#### **1.2.5.3. Cancérogénicité**

Il existe quelques composés des HEs capables d'induire la formation de cancers. Cas de dérivés d'allyles benzènes ou de propényle benzènes comme le saffrole (Sassafras), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), le  $\beta$ -asarone (*Acorus calamus*) (Piochon. M, 2008).

#### **1.2.6. Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles**

Les HEs ont de nombreuses propriétés médicinales en commun, elles sont efficaces pour de nombreux germes et virus ainsi que les mycoses. Chaque HE a sa spécificité thérapeutique. Les propriétés et les modes d'utilisation particuliers ont donné naissance à la phytothérapie (l'aromathérapie) (Ferhat. M, 2009).

- L'effet antibactérien dû généralement aux phénols (carvacrol, thymol), des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol) et des aldéhydes (néral, géraniol).

- L'effet antiviral des HEs constitue une aubaine pour traiter les virus qui donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles. Ces fléaux infectieux, sont très sensibles aux molécules aromatiques.
- L'effet antifongique des HEs est dû à la présence des monotérpéniques et sesquiterpéniques oxygénés et les lactones sesquiterpéniques. Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension.
- L'effet antiparasitaire est dû au groupe des phénols qui possède une action puissante contre les parasites.
- L'effet antiseptique est favorisé par les aldéhydes et les terpènes qui sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques, et qui s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Benayad. N, 2008).

### 1.2.7. Méthode d'analyse des HEs

#### - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilissables sans dégradation (non-thermolabiles). Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt (Rouessac. F et al, 2007).

#### - Spectrométrie de masse (SM)

C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter, d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique.

Son principe, réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

#### - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS)

C'est une méthode d'analyse qui combine les performances de la CPG et de la SM afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'analyse des HEs, en grande partie, en raison de la facilité de prise en main des systèmes de séparation et de détection performants, avec un coût relativement faible.

#### - Chromatographie en phase liquide à haute performance ou pression (HPLC)

La HPLC permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. La chromatographie en

phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. (HPLC Principe et appareillage, 2010).

### **1.3. Mise en évidence de la bioactivité d'*Inula Viscosa***

#### **1.3.1. Activité antibactérienne des HEs**

La première mise en évidence de l'action des HEs contre les bactéries a été réalisée en 1881, par Delacroix (Boyle. W, 1995). Depuis, de nombreuses HEs ont été définies comme antibactériennes (Burt. S, 2004). En effet, l'activité antibactérienne d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique. Les composants actifs les plus importants des HEs, sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, dont les mono et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie. Ces derniers ont des effets contre les bactéries (Chouitah, 2012).

#### **1.3.2. Activité antibactérienne des polyphénols**

Les CP possèdent des activités antibactériennes (Dahlia. M, 2012). Les composés appartenant aux acides phénoliques les plus représentatifs de ces activités sont les acides cinnamiques et caféïques, lesquels sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries. Les flavonoïdes avec leurs différentes classes, ont un grand potentiel antibactérien (Rezaire. A, 2012). En effet, ils s'attaquent à un très grand nombre de bactéries, avec une intensité qui diffère selon le micro-organisme et l'écosystème dans lequel il se trouve. Ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries notamment : *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* ... etc. (Akroum. S, 2011).

Les tanins ont joué un rôle important au cours de l'évolution des végétaux en leur conférant un avantage adaptatif vis-à-vis des agents pathogènes. Ils exercent leur activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire, qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Chaouche, 2014).

## **Chapitre 2**

### **Matériels et méthodes**

La partie « matériels et méthodes » présente les réactifs utilisés, les méthodes, les manipulations et les tests d'identification réalisés.

Après avoir récolter et sécher la plante, les tâches exécutées sont :

- ✓ Tests phyto-chimiques permettant d'identifier qualitativement la composition de la plante ;
- ✓ Extraction et caractérisation des huiles essentielles et des métabolites secondaires de la plante *Inula Viscosa* ;
- ✓ Analyse quantitative et qualitative de l'huile essentielle par la CPG/SM et l'analyse qualitative des polyphénols par HPLC ;
- ✓ Préparation et contrôle qualité d'une crème industrielle à base des extraits de la plante ;
- ✓ Synthèse du menthol ;
- ✓ Enfin, suivi de l'évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle et des métabolites secondaires.

## 2.1. Matériel

### 2.1.1. Matériel de laboratoire :

L'ensemble de matériel utilisé est regroupé dans le Tableau.2.1

Tableau.2.1 : Matériel de laboratoire utilisé durant le travail.

Etapes	Equipements & Matériels	Verrerie	Produits
Dessiccation et séchage	Etuve de séchage à convection		
Broyage	Broyeur électrique		
Test phytochimique	Plaque chauffante, Balance analytique, Spatule, Pompe à vide, Buchner, Lampe UV, Papier Wattman n°1	Cristallisateur, Fiole jaugée, Pipette graduée, Tubes à essai, Becher, Erlenmeyer	FeCl <sub>3</sub> , HCL, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Copeaux Mg, NH <sub>4</sub> OH, Anhydride acétique, CHCl <sub>3</sub> , Réactif de Mayer
Extraction	Chauffe-ballon, Rotavapeur (Rotary Evaporators Isolb), Pince, <i>I. Viscosa</i> , Tube Eppendorf gradué	Ballons 1L et 4 L, Clevenger gradué, Pipette pasteur, Seringue médicale	Pierre ponce, Ethanol, Méthanol, Ether de pétrole, Hexane
Identification et Cratérisation	CPG-SM, HPLC, Spectrophotomètre, UV-Visible		
Formulation	Plaque chauffante, Balance analytique, pH mètre, Microscope, photonique WF 10X-18MM, Centrifugeuse (Hettich EBA20)	Cristallisateur, Bêchers	HE <i>d'I. Viscosa</i> , Extrait éthanolique <i>d'I. Viscosa</i> , Extrait méthanoïque <i>d'I. Viscosa</i>
Etude Anti Bactérienne	Boîte de pétrie, Ecouvillon, Pipette pasteur, Bec bunsen, Etuve, Autoclave, Bain marie		Eau distillée, Eau physiologique stérile, Gélose MH, BHIB, Gaz butane, Papier Wattman, Extraits <i>d'I. Viscosa</i>

L'outil logistique utilisé pour le traitement de certains résultats est Microsoft Excel. Les propriétés des réactifs et les caractéristiques des différents appareils utilisés sont donnés en annexe 1 (Tableau. A.1 et Tableau.A.2).

### 2.1.2. Matériel végétal

#### Récolte et séchage de la plante

La partie aérienne (feuilles) de « *Inula Viscosa* » a été récoltée pendant la période de floraison, Les prélèvements ont été effectués au mois d'Avril, Mai et Juin 2021 (Fig.2.1) dans les communes : Iferhounene, village Soumeur (70 km au sud-est de Tizi-Ouzou) et Ouadhias (35 km au sud de la ville de Tizi-Ouzou).



Fig.2.1 : Photo de la plante *Inula Viscosa*

L'identification et la reconnaissance botanique de la plante *Inula Viscosa* a été effectuée par Mme HACID.F, enseignante au niveau du Département des Sciences Agronomiques de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomique à l'UMMTO.

Le matériel végétal (environ 9kg) cueilli, a été nettoyé des débris puis séché à une température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 15 jours (Fig.2.2).

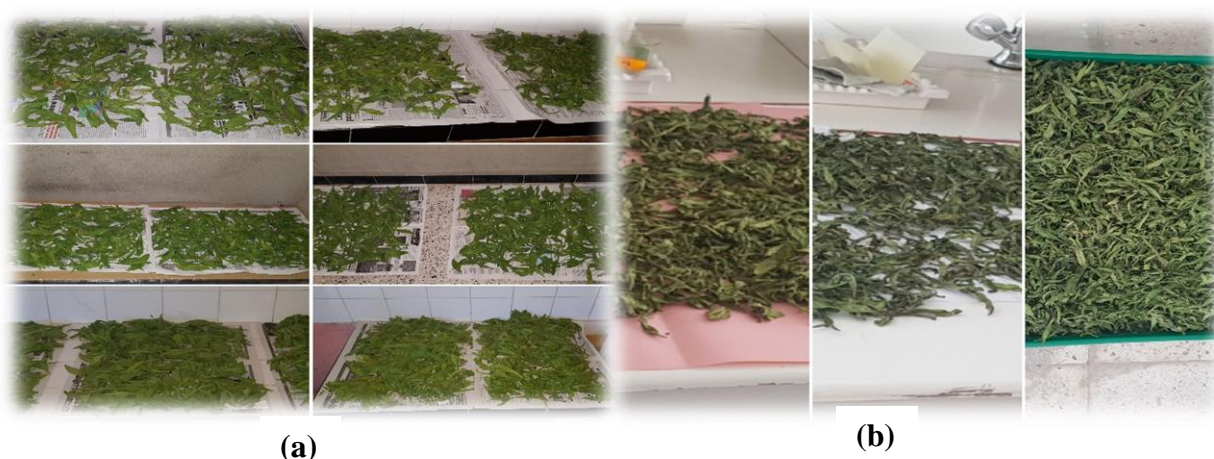


Fig.2.2 : Photo du séchage d'*Inula Viscosa* (a) Plante fraîche, (b) plante sèche

L'étape de séchage a pour but d'abaisser la teneur en eau des feuilles récoltées afin d'éviter toute réaction d'altération et la prolifération des micro-organismes.



- $m_2$  : Masse de l'échantillon après séchage (g)

### 2.2.2. Extraction de l'huile essentielle

Dans le souci de respecter au mieux les recommandations des normes, la matière végétale fraîchement cueillie (trois jours au plus tard avant l'extraction) est lavée, pesée et coupée en longueur avant d'être soumise à l'extraction. L'huile essentielle est alors extraite par hydrodistillation sur la partie aérienne de la plante (feuilles) (K.H.C. Baser., CRC Press, 2009).

La matière végétale sèche est placée dans un ballon rempli d'eau (2/3 du volume du ballon), celui-ci est relié à un appareil type Clevenger et soumis à ébullition, les vapeurs formées montent le long de la colonne en entraînant avec elles les huiles essentielles. Ces vapeurs sont condensées dans un réfrigérant, le condensât (eau + huile essentielle) est récupéré dans une ampoule à décanter. L'HE extraite reste collée sur les parois de l'appareil, elle est récupérée par l'ajout d'un volume de l'éther de pétrole/hexane. Après l'évaporation du solvant, l'HE est conservée dans des tubes Eppendorf gradués à basse température (4°C) et à l'abri de la lumière, (Fig.2.4).



Fig.2.4 : Photo du montage expérimental

#### 2.2.2.1. Détermination du rendement d'extraction

L'évaluation de chaque extraction (30 extractions) a été réalisée par le calcul du rendement qui est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse sèche de la matière végétale utilisée, donnée selon la relation (2.2) (Jean. B, 2009) ;

$$R_{HE} = \frac{m_{HE}}{m_S} \times 100 \dots (2.2)$$

- $R_{HE}$  : Rendement de l'huile essentielle (%)
- $m_{HE}$  : Poids de l'huile essentielle extraite (g).
- $m_S$  : Poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction (g).

### 2.2.2.2. Propriétés physiques de l'huile essentielle

**Densité relative :** La densité relative ( $d$ ) à 20°C d'une HE est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à 20°C à la masse d'un même volume d'eau distillée à 20°C. Elle est donnée par la formule (2.3). À l'aide d'un Eppendorf, nous avons pesé successivement des volumes égaux d'huile et de l'eau à l'aide d'une balance analytique, à la température de laboratoire 29°C.

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} + 0.0012 \dots (2.3)$$

- $M_0$  : masse de l'Eppendorf vide en gramme (g).
- $M_1$  : masse de l'Eppendorf remplie d'eau.
- $M_2$  : masse de l'Eppendorf remplie d'huile.

**Indice de réfraction :** L'indice de réfraction ( $n$ ) de l'HE a été mesuré avec le réfractomètre d'Abbe classique (annexe 1, Tableau.A.2 et Fig.A.1). L'indice est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

La valeur de l'indice est indiquée directement par l'échelle de lecture sur le réfractomètre, à la température de laboratoire 29°C.

### 2.2.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle

#### - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

L'analyse qualitative et semi-quantitative des HEs *d'Inula Viscosa* des deux régions par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, a été réalisée à l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene à Bab Ezzouar-Alger. Cette analyse a été menée sur deux colonnes de polarités différentes : HP5 MS apolaire de 30m et HP WAX polaire de 60m, équipées d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les conditions optimales d'analyse sont données dans le Tableau 2.3 ci-dessous :

Tableau 2.3 : Conditions opératoires de l'analyse par CPG/SM.

<b>Couplage CPG/SM</b>	
<b>Analyse par CG-FID</b>	<b>Analyse par CG-MS</b>
Appareil : Hewlett- Packard 6890 Colonnes : HP5 MS (film 30m x 0,32mm x 0,25mm épaisseur) et HP WAX polaire (film 60m x 0,32mm x 0,15mm) Gaz vecteur : Azote (N <sub>2</sub> ) Débit : 0,4 mL/min et 0,9 mL/min, respectivement dans ces deux colonnes	Appareil : Agilent MSD 5973A Mode d'ionisation : impact électronique Tension d'ionisation : 70 eV, basse résolution Balayage atomique : m/z 30 à 550 Température de la source : 280°C Pression : 2.10 <sup>-6</sup> Torr Gaz vecteur : Hélium (He) Débit : 0,5mL/min
Température de l'injecteur : 250°C Température du détecteur : 320°C Volume injecté : 0,2mL en split 1/100 Température des colonnes : 60°C/8min jusqu'à 250°C/15min à raison de 2°/min.	

Le pourcentage de chaque constituant dans l'essence est calculé par intégration des aires du chromatogramme.

#### 2.2.2.4. Identification des composés de l'huile essentielle

Les constituants de l'HE ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats, déterminés par rapport à une série de n-alcane C<sub>7</sub>-C<sub>28</sub> avec ceux de littérature injectés sur les deux colonnes dans les mêmes conditions que les huiles ainsi que par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux de la banque de spectres informatisée (Wiley 7N et NIST 11) et ceux de la littérature (Stein. S. E., 2008).

### 2.2.3. Polyphénols

#### 2.2.3.1 Matière végétale

Le matériel végétal a été nettoyé et séché à l'air libre pendant quinze jours. La plante est ensuite réduite en poudre fine avec un broyeur électrique puis stockée dans des boîtes hermétiques à l'abri de la lumière.

#### 2.2.3.2. Screening phyto-chimique

Le screening phyto-chimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence des groupes de familles chimiques présents dans une plante.

Le principe est basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant un ensemble de méthodes colorimétriques, ce qui permet de détecter les métabolites secondaires. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des

réactions de précipitations, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette (Charpentier. P et al, 2006).

### 2.2.3.3. Caractérisation et mise en évidence

Les protocoles d'identification phyto-chimiques des principales familles des métabolites secondaires sont résumés dans le Tableau.2.4, (Evans et W. Charles, 1989). Les photos représentant ces tests sont données en annexe 3 (Fig.A.1, Fig.A.2, Fig.A.3).

Tableau .2.4 : Protocoles d'identification phyto-chimique.

Identification	Protocole
Polyphénols	Mettre 2 mL d'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique) dans un tube à essai puis ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée.
Flavonoïdes	À 1 mL d'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique), ajouter 1 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl), puis quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est indiquée par une coloration rouge, orange ou rose.
Tanins	La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de chaque extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique), 1 mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl <sub>3</sub> diluée à 1%. L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins galliques.
Glycosides cardiaques	2mL de chloroforme sont ajoutés à 1mL de l'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique), l'apparition d'une coloration brun rougeâtre après l'ajout de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> indique la présence des glycosides cardiaques.
Anthocyanes	A 1mL de l'échantillon (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique), ajouter 1 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 10% et 1 mL de NH <sub>4</sub> OH. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si la coloration s'accroît en présence de l'acide et si elle vire au bleu violacé en milieu basique cela signifie la présence des anthocyanes.
Terpénoïdes	Leur détection consiste à traiter 0.5 mL de l'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique) avec 2 mL de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. En cas de réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre à la zone de contact des deux liquides.
Saponines	Préparer une infusion, de la plante dans de l'eau chaude. Mettre 3mL d'extrait dans un tube à essai, ajouter une petite quantité d'eau distillée, puis agiter fortement pendant 30 secondes et

	laisser reposer 15 secondes. Si la mousse persiste pendant cette période cela signifie qu'il y a des saponosides.
Quinones libres	1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté à 1 mL d'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique). Un test positif est révélé par la formation de la couleur rouge.
Dérivés anthracéniques libres	Les Anthracéniques libres sont détectées par l'ajout de 1mL d'extrait chloroformique et 1mL de NH <sub>4</sub> OH dilué dans un tube à essai. Après agitation, une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres. Extrait chloroformique : 500mg de poudre + 5mL de CHCl <sub>3</sub> chauffé 3min au bain marie. Solution est à chaud.
Alcaloïdes	Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec le réactif de Mayer. Introduire 10 g de poudre végétale sèche dans un erlenmeyer, à laquelle 50mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dilué au 1/10, macéré 24h ensuite, filtré et lavé pour compléter à 50mL, dans 1mL du filtrat, 5 gouttes de réactif sont ajoutées après 15min. L'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune claire, révèle la présence d'alcaloïdes.
Leucoanthocyanes	A 1mL de l'échantillon (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique), ajouter 1 mL d'alcool chlorhydrique et 200 µl d'alcool iso-amylque puis chauffé 15 min. La coloration rouge cerise confirme la présence des leuco anthocyane (flavonols, flavononols).
Stérols et tri terpènes	Les stérols et les terpènes sont recherchés par la réaction de Liebermann. 5 mL d'extraits (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique) évaporés sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique ; ajouter 0,5mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.
Coumarines	Dans un tube à essai, 5 mL d'extrait (hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique) est évaporé, puis 2 mL d'eau chaude sont ajoutés au résidu. La solution est partagée entre 2 tubes à essais. Au contenu de l'un des tubes, 0,5 mL est ajouté de NH <sub>4</sub> OH à 25%. La fluorescence est observée sous U.V à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

Anthraquinones	Prélever 5mL de l'hydrolysât et les mettre dans une ampoule à décanter, ajouter 5mL de chloroforme puis agiter sans formation d'émulsion. Soutirer la phase organique, l'introduire dans un tube à essai puis conserver la phase aqueuse. Ajouter de l'ammoniaque diluée (1mL) et agiter. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge. Si la réaction est négative ou faiblement positive, rechercher : O- et Chétérosides.
O-hétérosides à génine réduite	Prélever 5 mL d'hydrolysât, ajouter 3 à 4 gouttes de FeCl <sub>3</sub> à 10%, puis chauffer pendant 5 minutes au bain-marie et refroidir sous le courant d'eau et agiter avec du chloroforme (5mL), soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai. Ensuite ajouter de l'ammoniaque diluée (1mL) et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthronols ou des anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.
-C-Hétérosides	Reprendre la phase aqueuse qui a été gardée dans l'ampoule à décanter dans un tube à essai puis ajouter sur cette phase 10mL d'eau distillée, du chlorure ferrique à 10% (1mL) et porter au bain-marie pendant 30 min. Ensuite il faut refroidir sous courant d'eau et agiter avec du chloroforme (5mL). Soutirer la phase chloroformique puis ajouter de l'ammoniaque diluée (1mL) et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génine de C-hétérosides.

#### 2.2.3.4. Protocole d'extraction des polyphénols

L'extraction solide-liquide des polyphénols est la plus simple des méthodes de séparation. Elle est basée sur leur degré de solubilité dans les solvants organiques.

L'extraction a été réalisée par macération sur un matériel végétal, séché et broyé, des deux régions (Iferhounene et Ouadhias). Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal au contact d'un solvant.

Par macération, 20g de matière végétale (poudre) ont été extraits à raison de 1/10 (P/V) par différents solvants : le méthanol à 70%, l'éthanol à 70%. Le solvant couvre totalement le matériel végétal pendant 72 heures avec filtration et renouvellement de solvant chaque 24 heures à la température du laboratoire. Après filtration, le filtrat est récupéré à l'aide d'un rota-vapeur de marque Rotary Evaporators-Isolb, (Fig.2.5) conservé à l'abri de la lumière.

Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite, à 40°C, pour l'extrait hydro-méthanoïque pendant 2h, et à 70°C, pour l'extrait hydro-éthanolique pendant 1h.



Fig.2.5 : Schéma de la distillation sous-vide

### 2.2.3.5. Rendement d'extraction

L'évaluation du rendement de chaque extrait est déterminée selon l'équation suivante (2.4) :

$$R(\%) = \frac{M_e}{M_s} \times 100 \dots (2.4)$$

- $R(\%)$  : Rendement de l'extrait en pourcentage.
- $M_e$  : Masse de l'extrait brut (g).
- $M_s$  : Masse du matériel végétal sec.

### 2.2.3.6. Analyse qualitative des polyphénols

#### Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse qualitative des polyphénols par HPLC a été réalisée à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou à la faculté de médecine (Biomédical). L'appareil est présenté en annexe 4 (Fig.A.1).

Les composés phénoliques d'origine naturelle ont la propriété d'être solubles dans les solvants polaires, ce qui rend possible l'utilisation de la phase inverse en HPLC (RP-HPLC) pour leur dosage. Les conditions optimales d'analyse par HPLC sont :

- La colonne est de type  $C_{18}$  de 25 cm de longueur, composée de particules de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- Une température de 30°C et un volume d'injection de 10  $\mu\text{L}$ , avec un débit de 1 mL/min ;
- Détection UV à 280 nm et 230 nm. Le choix de cette longueur d'onde est établi en fonction des spectres d'absorbance des polyphénols ;

- Le temps d'analyse est de 40 min ;
- La phase mobile est constituée de deux solvants A et B. Le solvant A est de l'acide formique à 0.1%. Le solvant B est de l'Acétonitrile.

Les échantillons des polyphénols sont élués selon un gradient de concentration de :

- 0 à 3,2 min pour la phase mobile composée de 4% d'Acétonitrile et 96% d'acide formique ;
- 3,2 min à 32 min pour la phase mobile composée de 4% d'Acétonitrile et 100% d'acide formique ;
- 32 min à 34,4 min pour la phase mobile composée de 100% d'Acétonitrile ;
- 34,4 min à 36 min (100% à 4% de B) ;
- 36 min à 40 min pour la phase B 4%.

L'identification des pics se fait par comparaison à des composés de références. A cet effet, nous avons utilisé quatre standards d'étalonnages qui sont regroupées dans le Tableau.2.5.

Tableau.2.5 : Standards et temps de rétentions utilisés pour l'analyse par HPLC

N°	Standard	Temps de rétention (min)
1	Acide gallique	10.12
2	Acide caféique	16.33
3	Acide coummarique	18.16
4	Acide cinnamique	24.51

#### 2.2.4. Formulation galénique

La formulation choisie est la préparation d'une crème antiseptique.

Dans notre étude, quatre formulations distinctes sont préparées, à base des extraits de *Inula Viscosa* à 5%. Voir annexe 5 (Fig.A.1).

- Crème test (crème 1).
- Crème à base de l'huile essentielle (crème 2).
- Crème à base de l'extrait hydro-méthanoïque (crème 3).
- Crème à base de l'extrait hydro-éthanolique (crème 4).

##### 2.2.4.1. Composition et préparation des formulations

Les composants des crèmes formulées et leur rôle sont résumés dans le Tableau.2.6.

Tableau.2.6 : Composants de la formulation galénique avec leur rôle.

Composant	Rôle	Composant	Rôle
Huile essentielle	Principe actif pour la crème 2	Cire d'abeille	Emollient, Agent filmogène
Polyphénols (extrait hydro-méthanoïque)	Principe actif pour la crème 3	Beurre de karité	Adoucissant
Polyphénols (extrait hydro-éthanolique)	Principe actif pour la crème 4	Acétate de glycérol	Tensoactif (E/H)
Benzoate de sodium Sorbate de calcium	Antibactérien Conservateur	Cétéarate-20	Tensioactif (H/E)
Acide citrique Citrate de sodium	Additif pour stabiliser le pH (régulateur d'acidité)	Dicaprylyl Carbonate	Émollient à propagation rapide
Glycérine	Agent hydratant pour la peau en lui conférant une grande douceur, Co-émulsifiant pour augmenter la stabilité et la viscosité des émulsions, émolliente.	Coco-Caprylate	Emollient
		Alcool cétéarylique	Emulsifiant, agent texturisant, agent épaississant pour la phase grasse.
		Huile d'amande douce	Hydratante et protège la peau, apaisante, soulage les irritations et les démangeaisons.
Gomme de xanthane	Gélifiante et épaississante de la phases aqueuse.	$\alpha$ -tocophérol	Antioxydant, conservateur.
Eau distillée	Solvant.		

#### 2.2.4.2. Contrôle qualité de la formulation pharmaceutique

##### 2.2.4.2.1. Examens physiques

**Test de la goutte :** Ajout d'une petite quantité de la crème formulée de chaque extrait dans de l'eau et de l'huile (huile d'amande douce), pour observer si elle se disperse. Les émulsions de type huile dans l'eau (H/E) se disperse facilement dans de l'eau à l'inverse des émulsions de type eau dans l'huile (E/H), (annexe 5, Fig.A.2). Le critère de qualité étant de vérifier la bonne dispersion du principe actif dans la phase (excipient).

**Test de centrifugation :** La stabilité des crèmes formulées est vérifiée en utilisant une centrifugeuse de marque (Hettich EBA20), (annexe 5, Fig.A.3).

Nous avons mis une quantité de chaque crème préparée (1, 2, 3 et 4) dans quatre tubes en plastique, réglé à 6000 tours par minute pendant 30 minutes.

**2.2.4.2.2. Examen macroscopique :** Cet examen consiste à apprécier les caractères organoleptiques tels que l'aspect, la couleur, l'odeur, l'absorption, granule, et l'homogénéité ainsi que la réalisation d'un test d'étalement (absence d'agrégats visibles à l'œil nu, et une bonne diffusion à travers la peau).

**2.2.4.2.3. Examen microscopique :** La vérification de l'homogénéité de la crème a été vérifiée en utilisant un microscope photonique de marque WF 10X-18MM, (annexe 5 (Fig.A.4) et (Fig.A.5)).

**2.2.4.2.4. Mesure du pH :** Le pH de la crème est déterminé par un pH mètre.

Ce premier doit être neutre pour éviter toute irritation de la peau. La crème doit être conservée à l'abri de la lumière et de la chaleur dans des pots en plastiques ou en verre brun, tubes avec une fermeture vissée et étanche afin d'éviter l'oxydation de la substance.

## **2.2.5. Synthèse du menthol**

Dans cette étape, nous avons voulu apporter une odeur agréable à la crème formulée. Le salicylate de méthyle également connu sous le nom de gaulthérie, est une huile d'origine naturelle avec une très forte odeur de menthe, que nous pouvons trouver dans de nombreuses espèces végétales différentes. Elle est souvent extraite comme huile essentielle.

Pour synthétiser la gaulthérie, nous utilisons l'aspirine (ont une structure similaire). Ils sont tous les deux dérivés de la molécule d'acide salicylique.

La molécule d'acide salicylique, va subir une réaction d'estérification où le méthanol réagit avec l'acide carboxylique pour former un ester de méthyle, puis détruire ce dernier pour former un alcool, voir Fig.2.6.

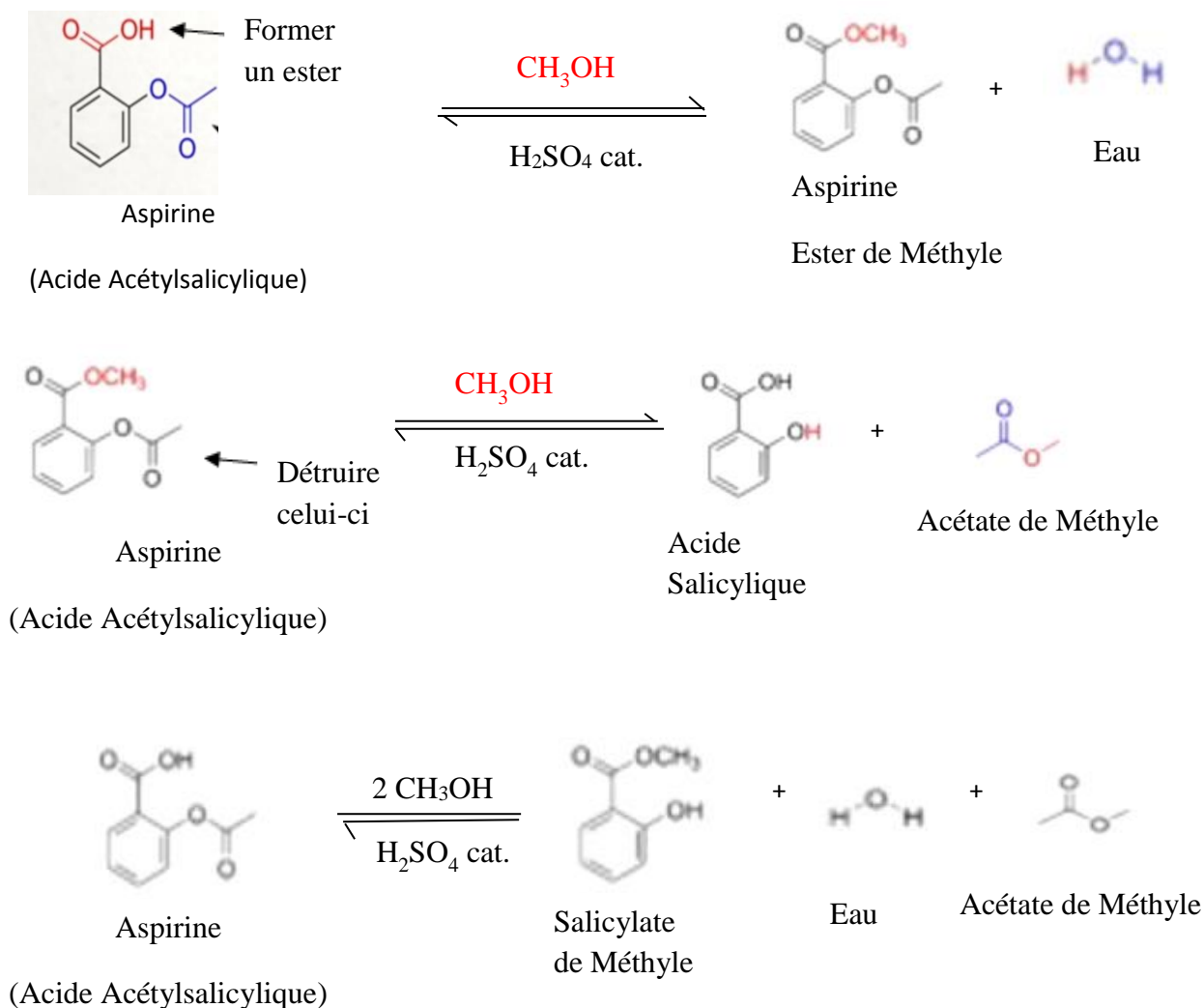


Fig.2.6 : Réactions d'estérification de l'acide Acétylsalicylique

Pour synthétiser le menthol, nous avons suivi les étapes suivantes (Fig.2.7) :

- 10 sachets de 500 mg d'aspirine (Aspégic) ;
- Ajouter 36 mL de méthanol et laisser le tout sous agitation pendant 1h ;
- Filtration avec du papier Wattman n°1 ;
- Rajouter petit à petit 5 mL d'acide sulfurique au filtrat, sous agitation ;
- Mettre le produit sous un montage à reflux ;
- Verser la solution dans une ampoule à décanter en lui ajoutant de l'eau froide ;
- Récupérer le sédiment et lui ajouter du bicarbonate de sodium ;
- Filtration sous vide (Büchner) ;
- Récupérer la phase organique sous forme de cristaux et laisser sécher.



Fig.2.7 : Etapes de la synthèse du menthol

### 2.2.6. Activité biologique : étude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'HE et de l'extrait organique de la plante *I. Viscosa* a été mise en évidence en utilisant quatre souches bactériennes qui nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomique à UMMTO. À savoir : *Escherichia-coli*, ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC14028 ; *Bacillus Subilis*, ATCC6633 et *Staphylococcus aureus*, ATCC6538. Elles sont toutes bacilles et mobiles à l'exception de *Staphylococcus aureus*, elle est cocci et immobile. Les caractéristiques des souches bactériennes testées, sont détaillées dans le Tableau.2.7 :

Tableau.2.7 : Principales caractéristiques des souches bactériennes testées (Fauchère., J.L Avril, 2002).

Famille/ Genre et espèce	Caractères biologiques	Habitat	Pouvoir pathogène
<i>Entero-Bacteriaceae</i> , <i>Escherichia-coli</i> à Gram -	Aérobie facultatif, Oxydase-, Lactose+, Indole+	Tube digestif de l'homme et des animaux	Diarrhées ; Gastroentérites ; Infections urinaires; Méningites ; Septicémies
<i>Pseudo-monadaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Aeruginosa</i> à Gram -	Aérobie strict Oxydase +	Comensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux	Infections nosocomiales

<i>Micro-coccaceae, Staphylococcus Aureus</i> à Gram +	Aérobie facultatif catalyse+ ; oxydase- ; Coagulase+	Peau et muqueuses	Infection pyogènes graves
<i>Bacillaceae, Bacillus Subilis</i> à Gram +	Aéro-anaérobie facultatif Oxydase- ; Eatalase+	Sol, poussière, eau, air et plantes	/

### 2.2.6.1. Revivification des souches bactériennes

Les souches nous ont été fournies revivifiées sur du bouillon BHIB, dans le but de les remettre à leur état physiologique normal, et incubées à 37°C pendant 24h afin de stimuler leur développement. Les souches purifiées sont conservées dans le réfrigérateur à +4 C°, après culture sur gélose nutritive inclinée en tube à essai.

### 2.2.6.2. Préparation des pré-cultures

Les souches bactériennes à tester sont cultivées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) et incubées pendant 18h à une température de 37C° afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées.

### 2.2.6.3. Préparation de la suspension bactérienne

À partir d'une culture jeune de 18h sur GN, racler (prélever) à l'aide d'un écouvillon des colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'écouvillon dans 9 mL d'eau physiologique stérile à 0.9%, agiter à l'aide d'un vortex pour bien homogénéiser la suspension bactérienne. La standardisation de la suspension est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm. Une densité optique (DO), comprise entre 0.08 et 0.1, correspond à une concentration qui avoisine 10<sup>8</sup> cellules / mL. La Fig.2.8 montre les étapes de la préparation de l'inoculum.

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'HE et de l'extrait organique de l'inule visqueuse, nous avons adopté la méthode de diffusion sur discs, également appelée méthode de diffusion sur milieu d'agar en utilisant des disques stériles en cellulose. Elle est dite qualitative car elle permet d'identifier l'existence ou non d'une éventuelle propriété antibactérienne.

C'est une technique qui consiste à utiliser des disques imprégnés de différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose ensemencée au préalable avec une suspension de la bactérie à étudier. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par

la mesure d'une zone d'inhibition qui est représentée par une auréole formée autour du disque où aucune croissance n'est observée (Wilkinson, 2006).

La souche sera ainsi qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Bouharb et al., 2015).

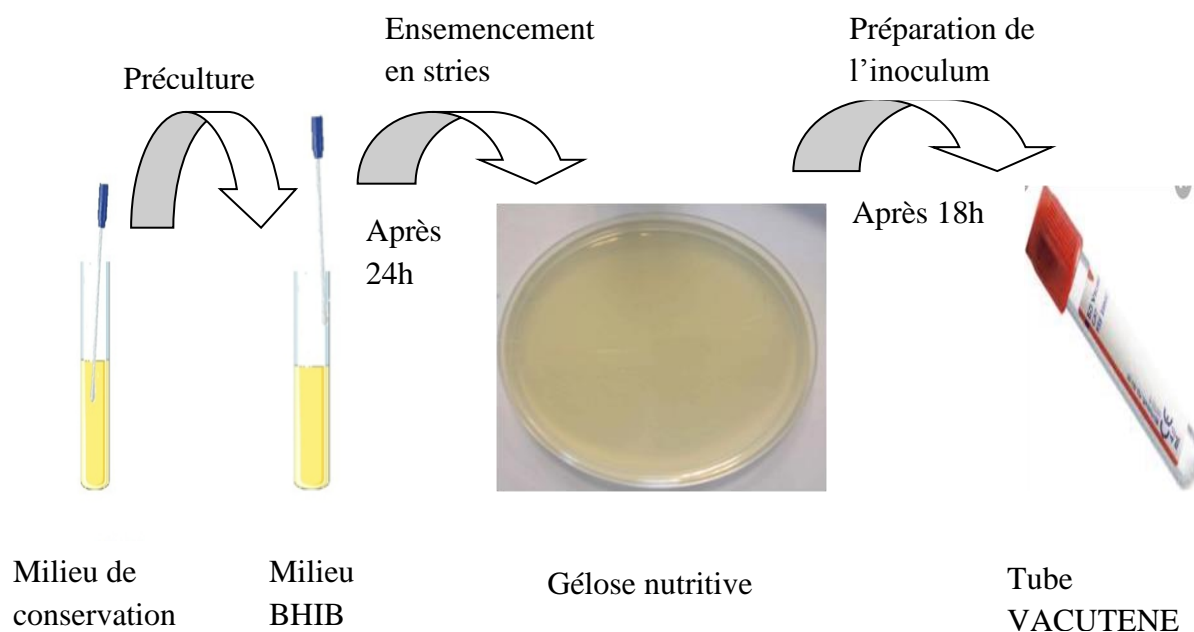


Fig.2.8 : Préparation de l'inoculum

#### 2.2.6.4. Ensemencement

15 mL de la gélose Mueller Hinton (MH) est coulé aseptiquement dans 8 boîtes de Pétries. Après refroidissement et solidification de la gélose (MH) sur la paillasse, l'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60°.

#### 2.2.6.5. Préparation des disques

Des disques sont déposés délicatement sur le milieu gélosé, préalablement fabriqués à partir du papier Wattman N°1 suivant le diamètre de l'emporte-pièce (6mm) ; ils sont ensuite mis dans des tubes à essai et stérilisés à l'autoclave.

#### 2.2.6.6. Préparation de l'agent antimicrobien

1g de l'extrait hydro-méthanoïque et 1g de l'extrait hydro-éthanolique de la plante *I. Viscosa* (Ouahdias) sont dilués dans 4 mL d'eau distillée chaude pour chacun (concentration à 25%). L'HE a été diluée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les disques de papier Wattman

N°1 sont alors imprégnés avec 10  $\mu$ L de ces solutions antimicrobiennes. (À noter que nous avons effectué 2 tests, 8 boîtes dont 2 tests pour chaque souche bactérienne).

#### 2.2.6.7. Dépôt des disques

Tout en travaillant dans la zone stérile avec deux bécuns, et dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques sont déposés sur la gélose. Un disque d'ATB et des disques imprégnés des extraits dilués, de l'HE diluée ainsi que du DMSO, sont également déposés sur la même boîte afin de servir respectivement de témoin positif et de témoin négatif. Les boîtes de Pétries sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 15 min, puis incubées à 37°C pendant 24h.

#### 2.2.6.8. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (DZI) autour de chaque disque à l'aide d'une règle en millimètre (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité est classée par les diamètres d'inhibition de la croissance microbienne en cinq classes :

- Très forte inhibition:  $D \geq 30$  mm
- Forte inhibition:  $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$
- Moyenne inhibition:  $16\text{mm} \leq D \leq 20$  mm
- Légère inhibition:  $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$
- Pas d'inhibition:  $D \leq 10$  mm

L'ATB utilisé pour les quatre souches est l'AZTREONAM. (ATM 30  $\mu$ g).

## **Chapitre 3**

### **Résultats et discussions**

Dans cette partie, nous exposons les résultats obtenus :

- De l'étude phyto-chimique ;
- De la teneur en humidité ;
- Des rendements des extractions de l'huile essentielle et des polyphénols ;
- De l'analyse et l'identification des extraits ;
- De la formulation galénique et contrôle qualité;
- De l'évaluation de l'activité antibactérienne *d'Inula Viscosa*.

### 3.1. Détermination de la teneur en eau

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau de la plante étudiée et de connaître la durée de séchage pour chaque région. Le tableau.3.1 résume les résultats trouvés.

Tableau.3.1 : Taux d'humidité des feuilles *d'I. Viscosa* des deux régions.

Région	Masse de la matière fraîche (g)	Masse de la matière sèche (g)	Teneur en eau (%)	Teneur en matière sèche (%)
Iferhounene	250	53.53	78.59	21.41
Ouadhias	250	57.45	77.02	22.98

Les résultats obtenus indiquent un taux d'humidité important compris entre 75 à 80 %. Cela signifie que la majeure partie de la plante est constituée d'eau. Nous constatons que la plante *I. Viscosa* des deux régions sont très riches en eau avec un taux de 78.59 % (Iferhounene) et 77.02 % (Ouadhias), (Fig.3.1).

Les échantillons de Boukemaya., Messaoudi, (2016), révèlent un taux d'humidité compris entre 56% à 82%. Selon leurs résultats, le taux d'humidité de la plante *I. Viscosa* de Cap Djenet est très riche en eau, avec un taux d'environ 77.7%, comparée à celle de la région de Draâ El Mizan qui montre une teneur en eau 70.9%. Kheyar, 2009, souligne un taux de 81.66% dans la région de Tichy (Bejaïa).

Cette différence serait dû aux facteurs climatiques du milieu et le moment de la récolte (Abdoune, 2012).

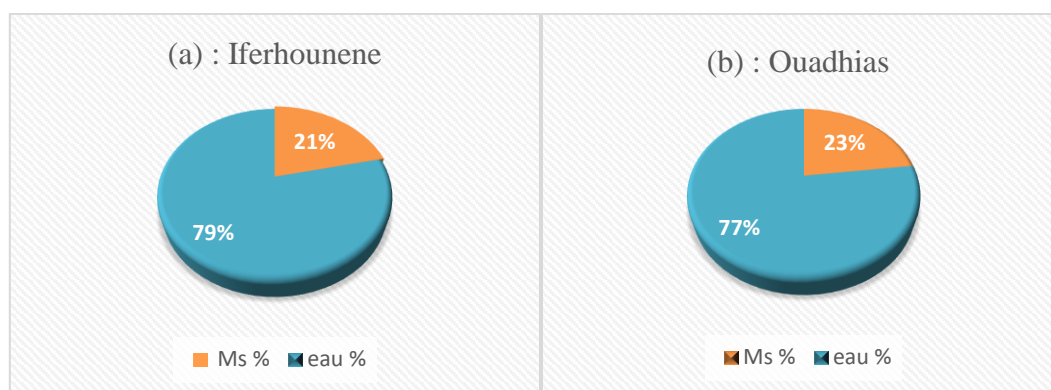


Figure 3.1 : Teneur en eau et en matière sèche (MS) *d’Inula Viscosa* des deux régions. (a) : région d’Iferhounene, (b) : région de Ouadhias.

### 3.2. Extraction de l’HE *d’I. Viscosa*

#### 3.2.1. Rendement de l’HE extraite

Nous avons réalisé des extractions (30 extractions) de l’HE *d’I. Viscosa* pour les deux régions par hydrodistillation avec l’appareil Clevenger pendant 3h sous deux états de la plante : état frais, état sec, et sous forme de poudre. Les rendements d’extraction sont résumés dans le Tableau.3.2 et la Fig.3.2. Au vu des résultats, il apparaît que le rendement moyen en HE obtenue est très faible et est presque identique pour les deux régions.

Tableau.3.2 : Rendements de l’HE des feuilles (fraîches, sèches) et de la poudre.

Récolte		Rendement %		
Période	Lieu	Feuille fraîches	Feuilles sèches	Poudre
Avril-Mai-Juin	Iferhounene	0.075	0.13	0.07
	Ouadhias	0.080	0.19	0.075

Les résultats indiquent que le rendement en HE extraite à partir des feuilles de la plante sèche est meilleur que celui obtenu à partir de la plante fraîche et de la plante broyée.

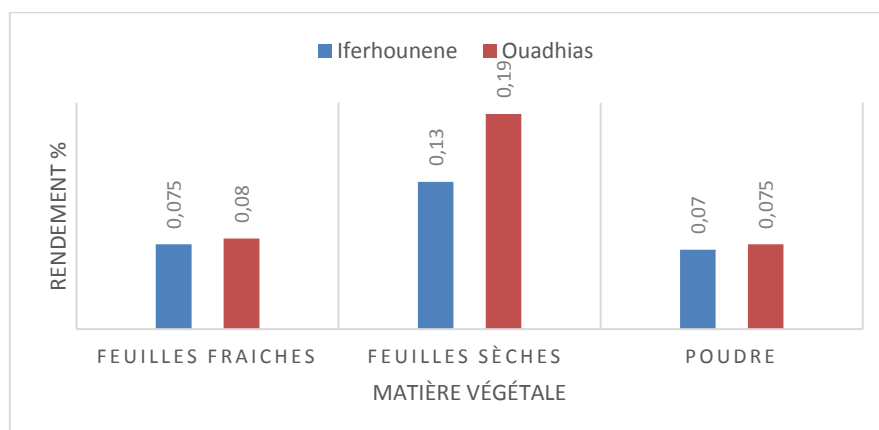


Fig.3.2 : Rendements d’extraction de l’HE *d’I. Viscosa* des deux régions.

Néanmoins, nous remarquons que la région de Ouadhias a enregistré un meilleur rendement par rapport à la région d'Iferhounene. Cette faible teneur est probablement due, à la température, au mode d'extraction, à la période et lieu de la récolte de la plante.



Fig.3.3 : HE d'*Inula Viscosa*

Dans le Tableau 3.3 nous avons regroupé certains résultats des travaux antérieurs réalisés sur la même plante ainsi que les facteurs endogènes et exogènes pouvant fluctuer le rendement d'extraction de l'HE.

Tableau 3.3 : Rendements d'extraction de l'HE de *I. Viscosa*. Résultats des travaux antérieurs

Auteur	Récolte		Rendement (%)		
	Période	Lieu	Feuilles		Poudre
			Fraîches	Sèches	
<b>Résultats de notre étude</b>	Avril, Mai, Juin	Iferhounene (1200m) ; Ouadhias (425m)	0.075	0.13	0.070
			0.080 (34g)	0.19 (55g)	0.075 (34g)
<b>Aklil et Bandou, 2017</b>	Février	Boumerdes (Hmadi à 32 m d'altitude et Benyounes 47 m d'altitude )	0.16 0.15		/
<b>Benyahia, 2014</b>	Mars	Ouest algérien, Nedrouma (650m); Mansourah (1031m) ; Ain Fezza (1000m); Ain Temouchent (143m); Honaine (380m).	0.05		0.09
<b>Benhammou, 2014</b>	Avril	Annaba	/		0.19
<b>Ben Amor, 2013</b>	Mars, Avril	Sidi R'zin 10 km au Sud d'Alger	0.21 (600g) 0.37(1600g)		/
<b>Boumaza, 2011.</b>	Janvier, février 2009. Mars, avril 2010.	Oran (429m).	0.24		0.32

### 3.2.2. Caractérisation de l'HE d'*I. Viscosa*

#### 3.2.2.1. Caractérisation physique et organoleptique

Cette étape est l'une des étapes primordiales pour la détection et la détermination de la qualité de l'HE. Elle renferme les différentes propriétés physico-chimiques qui assurent une bonne qualité des HEs. Le calcul de la densité relative est l'un des paramètres qui nous confirme la pureté de l'huile essentielle. L'indice de réfraction permet de connaître la teneur en mono terpènes. Si la valeur de l'indice est élevée, la valeur en mono terpènes est importante, mais si la valeur est faible c'est la teneur en dérivés oxygénés qui est remarquable.

#### 3.2.2.2. Paramètres physico-chimiques

Les caractéristiques de l'HE de la plante *I. Viscosa*, sont résumées dans le Tableau.3.4 et sont comparées aux valeurs de la norme AFNOR et à celles de la pharmacopée Européenne. Tableau.3.4 : Caractéristiques de la plante *I. Viscosa* comparées aux normes AFNOR et Pharmacopée Européenne.

Paramètres physico-chimiques	<i>Inula Viscosa</i> (Ifarhounene - Ouadhias) respectivement	AFNOR	Pharmacopée européenne
Aspect	Limpide clair et visqueux, collant	/	Liquide mobile limpide
Couleur	Jaune pâle	/	Jaune clair
Odeur	Agréable attirante et persistante		Forte agréable et épicée
Densité relative à 20 °C	1.5012 - 2.5012	0.894 à 0.930	0.935
Indice de réfraction	1.519 - 1.517 Ir de l'HE de référence : 1.485	1.483 à 1.510	1.505

Les valeurs expérimentales trouvées sont différentes mais restent proches des valeurs données par les normes AFNOR et pharmacopée Européenne. En plus de la composition chimique de la plante, nous expliquons ces écarts par les mauvaises conditions expérimentales.

#### 3.2.2.3. Identification et analyse de l'huile essentielle par CPG/SM

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences extraites par hydrodistillation, a été effectuée par CPG/SM en impact électronique (IE) sur deux phases stationnaires différentes : apolaires HP5 MS apolaire (Poly méthyle siloxane, 30m x 0,32mm x 0,25µm) et HPWAX polaire (60m x 0,32mm x 0,15mm). L'identification a été réalisée par comparaison avec les spectres de masse déjà référencés et à ceux de la banque de spectres (Nist et Wiley

07). L'injection des n-alcane C<sub>7</sub>-C<sub>28</sub>, sous les mêmes conditions opératoires a permis de calculer les indices de rétention de tous les pics.

L'analyse par CPG/SM nous a permis d'identifier 73 composés représentant 31.291% de la composition totale de l'HE des feuilles d'*I. Viscosa* pour la région d'Iferhounene (haute altitude) et 43.856% pour celle de la région de Ouadhias (basse altitude). Les résultats indiquent que le composé majoritairement présent est le caryophyllene oxide avec un pourcentage de 3.943% avec un temps de rétention de 31.042 min (Iferhounene) et de 7.872% avec un temps de rétention de 30.388 min (Ouadhias). Les composés identifiés, leurs indices de rétention ainsi que leurs teneurs relatives sont reportés dans le Tableau.3.5 et Tableau.3.6. (Les spectres correspondants sont donnés en annexe 2).

Tableau.3.5 : Composition de l'HE d'*I. Viscosa* de la région d'Iferhounene.

N°	Composés	IR (min)	%	N°	Composés	IR (min)	%
1	$\alpha$ -pinène	5.518	0.094	39	alloaromadendrene	27.125	0.126
2	camphène	6.066	0.069	40	$\alpha$ -curcumène	27.923	0.616
3	sabinène	7.168	0.014	41	trans- $\beta$ -ionone	27.999	0.448
4	$\beta$ -pinène	7.284	0.040	42	Calamenene-10-11 epoxy	28.157	0.293
5	Myrcène	8.153	0.029	43	$\alpha$ -Selinene	28.244	0.209
6	$\alpha$ - phellandrène	8.773	0.021	44	$\alpha$ -muurolène	28.413	0.190
7	p-cymene	----	----	45	$\beta$ - bisabolène	28.693	0.031
8	limonène	10.070	0.085	46	$\delta$ -cadinène	29.118	0.200
9	1,8-cinéole	10.169	0.129	47	Italicene ether	29.439	0.316
10	benzene acetaldehyde	10,891	0.021	48	$\alpha$ -copaene- 11-ol	29.707	0.868
11	terpinolène	13.052	0.011	49	Sesquisabinene hydrate <cis->	29.824	0.107
12	linalool	13,743	0.025	50	Z-Nerolidol	30.290	0.205
13	nonanal	13.941	0.052	51	E-Nerolidol	30.529	1.386
14	camphre	15.584	1.633	<b>52</b>	<b>caryophyllene oxide</b>	<b>31.042</b>	<b>3.943</b>
15	Bornéole	16.511	0.010	53	fokienol	31.607	3.627
16	a-phellandren-8-ol	16.621	0.010	54	humulene epoxide II	31.683	0.239
17	terpinène-4-ol	16.994	0.012	55	Cubenol <1-epi->	32.079	2.443
18	p-cymène -8-ol	17.420	0.030	56	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol	32.563	1.195
19	décanal	18.283	0.037	57	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	32.680	0.486

20	$\beta$ -cyclocitral	18.743	0.019	58	Aromadendrene epoxide <allo->	32.755	0.315
21	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)	21.285	0.080	59	Himachalol	----	----
22	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-(2.alpha.,4a.beta.,8a.beta.)	21.483	0.135	60	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	33.123	3.559
23	thiaspirane A	21.652	0.110	61	$\beta$ -Bisabolol	33.577	1.539
24	undecanal	22.101	0.039	62	Bisabolol < $\alpha$ ->	33.886	0.354
25	thiaspirane B	22.275	0.160	63	Muurolene <14-hydroxy- $\alpha$	34.160	0.179
26	(E)-Hex-3-enyl (E)-2-methylbut-2-enoate	22.730	0.084	64	$\alpha$ - sinensal	34.393	0.155
27	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl	23.552	0.022	65	$\beta$ -castol	34.486	0.043
28	Cyclosativene	24.053	0.020	66	$\alpha$ - Curcumen-15-al	34.621	1.045
29	$\alpha$ -copaène	24.368	0.151	67	$\gamma$ - Curcumen-15-al	36.025	0.716
30	E- $\beta$ -Damacenone	24.712	0.015	68	$\alpha$ -costol	36.229	0.451
31	sesquithujène	24.904	0.090	69	Muurolene <14-hydroxy- $\alpha$ ->	36.340	0.150
32	z-caryophyllène	25.808	0.567	70	eicosane	46.338	0.186
33	E-caryophyllène	26.286	0.096	71	tricosane	48.448	0.300
34	trans- $\sigma$ -Bergamotene	26.379	0.039	72	tetracosane	51.083	0.149
35	$\beta$ -dihydro-ionone	26.472	0.044	73	pentacosane	52.429	0.455
36	6,9-Guaiadiene	26.595	0.097	74	hexacosane	54.283	0.235
37	$\alpha$ -humulène	26.892	0.055	75	heptacosane	56.119	0.333
38	Geranyl acetone	26.979	0.054				

L'analyse par CPG-MS (région Iferhounene), a fourni 73 pics correspondant à 73 composés volatils. D'une manière générale l'HE contient des hydrocarbures mono et sesquiterpéniques en quantité moindre, alors que les dérivés oxygénés comptent parmi leurs constituants majoritaires. L'étude montre une prédominance du caryophyllène oxide (3.943%), suivi de fokienol (3.627%), Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (3.559%), Cubenol <1-epi-> (2.443%), camphre

(1.633%),  $\beta$ -Bisabolol (1.539%), E-Nerolidol (1.386%), caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol (1.195%) et  $\alpha$ -Curcumen-15-al (1.045%), les autres composés sont à l'état de traces.

Tableau.3.6 : Composition de l'HE d'*I. Viscosa* de la région de Ouadhias.

N°	Composés	IR (min)	%	N°	Composés	IR (min)	%
1	$\alpha$ -pinène	5.156	0.187	39	alloaromadendrene	26.658	0.253
2	camphène	5.663	0.120	40	ar-curcumène	27.450	0.481
3	sabinène	6.695	0.044	41	trans- $\beta$ -ionone	27.526	0.873
4	$\beta$ -pinène	6.800	0.081	42	Calamenene-10-11 epoxy	27.672	0.553
5	Myrcène	8.327	0.144	43	$\alpha$ -Selinene	27.754	0.560
6	$\alpha$ - phellandrène	8.379	0.086	44	$\alpha$ -muurolène	27.946	0.399
7	p-cymene	9.340	0.07	45	$\beta$ - bisabolène	28.167	0.343
8	limonène	9.545	0.139	46	$\delta$ -cadinène	28.651	0.236
9	1,8-cinéole	9.644	0.148	47	Italicene ether	28.943	0.353
10	benzene acetaldehyde	----	----	48	$\alpha$ -copaene- 11-ol	29.176	1.459
11	terpinolène	----	----	49	Sesquisabinene hydrate <cis->	29.304	0.120
12	linalool	----	----	50	Z-Nerolidol	29.671	0.217
13	nonanal	----	----	51	E-Nerolidol	29.916	1.916
14	camphre	15.018	2.656	<b>52</b>	<b>caryophyllene oxide</b>	<b>30.388</b>	<b>7.872</b>
15	Bornéole	16.090	0.183	53	fokienol	30.948	6.942
16	a-phellandren-8-ol	17.180	0.158	54	humulene epoxide II	31.140	0.455
17	terpinène-4-ol	----	----	55	Cubenol <1-epi->	31.536	0.183
18	p-cymène -8-ol	----	----	56	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol	31.933	1.534
19	décanal	----	----	57	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	32.055	0.550
20	$\beta$ -cyclocitral	----	----	58	Aromadendrene epoxide <allo->	32.125	0.401
21	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)	----	----	59	Himachalol	32.317	0.526
22	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-	21.021	0.224	60	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	32.451	4.014

	hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-,(2.alpha.,4a.beta.,8a.beta.)						
23	thiaspirane A	21.191	0.132	61	$\beta$ -Bisabolol	32.935	1.134
24	undecanal	21.773	0.016	62	Bisabolol < $\alpha$ ->	33.332	0.892
25	thiaspirane B	----	----	63	Muurolene <14-hydroxy- $\alpha$	33.740	0.447
26	(E)-Hex-3-enyl (E)-2-methylbut-2-enoate	----	----	64	$\alpha$ - sinensal	----	----
27	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl-	----	----	65	$\beta$ -castol	33.868	0.164
28	Cyclosativene	----	----	66	$\alpha$ - Curcumen-15-al	34.060	1.014
29	$\alpha$ -copaène	23.912	0.601	67	$\gamma$ - Curcumen-15-al	35.453	1.065
30	E- $\beta$ -Damacenone	----	----	68	$\alpha$ -costol	35.611	0.724
31	sesquithujène	----	----	69	Muurolene <14-hydroxy- $\alpha$ ->	----	----
32	z-caryophyllène	25.329	0.523	70	eicosane	45.822	0.171
33	E-caryophyllene	25.836	0.101	71	tricosane	47.938	0.549
34	trans- $\sigma$ -Bergamotene	----	----	72	tetracosane	50.643	0.210
35	$\beta$ -dihydro-ionone	----	----	73	pentacosane	51.925	0.878
36	6,9-Guaiadiene	----	----	74	hexacosane	53.808	0.328
37	$\alpha$ -humulène	----	----	75	heptacosane	55.632	0.427
38	Geranyl acetone	----	----				

Pour la région Ouadhias l'analyse par CPG-MS a fourni 53 pics correspondant à 53 composés volatils. D'une manière générale, l'HE de cette région contient des hydrocarbures mono et sesquiterpéniques en quantité moindre, alors que les dérivés oxygénés comptent parmi leurs constituants majoritaires. L'étude montre une prédominance du caryophyllene oxide (7.872%), suivi de fokienol (6.942%), Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (4.014%), camphre (2.656%), E-Nerolidol (1.916%), Caryophylla-4(12),8(13) -dien-5- $\alpha$ -ol (1.534%),  $\alpha$ -copaene- 11-ol (1.459%),  $\beta$ -Bisabolol (1.134%),  $\gamma$ - Curcumen-15-al (1.065%) et  $\alpha$ - Curcumen-15-al (1.014%), les autres composés sont à l'état de traces.

Le caryophyllene oxide (ou bêta-Caryophyllene oxide) (Fig.3.4) est un époxyde, dérivé d'acétate est un sesquiterpène naturel bicyclique. Il joue un rôle de métabolite de plante et d'attractif pour les insectes. De structure cristalline solide incolore, insoluble dans l'eau, soluble dans la graisse, soluble dans l'éthanol.

Le caryophyllene oxide est présent dans un grand nombre de plantes dans le monde, possède des activités analgésiques, et anticancéreuses significatives, affectant la croissance et la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses.

En revanche, le caryophyllene oxide est utilisé comme parfum chimique. Analogue aux monoterpènes R-limonène et linalol, il s'auto-oxyde lorsqu'il est exposé à l'air.

Il est très irritant pour la peau, ceci doit nous mettre en garde contre l'utilisation directe de l'HE de la plante sur la peau, une fois qu'elle a été exposée à l'air et à la chaleur.

Il est à signaler que des individus de la même espèce botanique, ayant le même génome et le même phénotype (chemotype), peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique. Celle-ci est due à l'influence de nombreux facteurs autres que la détermination génétique, comme la qualité du sol, le climat, l'altitude, l'hygrométrie, etc (Deschepper. R, 2017., Gabriel. W, 2005).

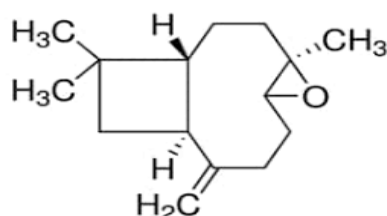


Fig.3.4 : Structure chimique du Caryophyllene oxide

Abdoune. Y, (2012), a identifié 10 constituants représentant 48,98% du premier lot de l'HE obtenue par entraînement à la vapeur d'eau. Le E-Nerolidol est le composé majoritaire avec 60,03 %, de même 14,04 % de Fokienol et 11,88 % de 12-Carboxyudesma-3, 11 (13)-diène.

L'analyse par GC/MS a montré que l'huile essentielle obtenue lors de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau est fortement riche en 12-Carboxyudesma-3, 11 (13)-diène (39,16%).

Les résultats de l'analyse du deuxième lot de l'HE extraite par hydrodistillation, ont identifié environ 63,65% de la composition avec un pourcentage très élevé en E-Nerolidol (31,45 %).

Abdoune a déduit que les pourcentages des composés extraits sont en fonction du procédé d'extraction. L'extraction de 12-Carboxyudesma-3, 11 (13)-diène est favorisée par l'hydrodistillation par contre l'entraînement à la vapeur d'eau favorise l'extraction de E-Nerolidol.

### 3.3. Screening phyto-chimique

Les tests de caractérisation phyto-chimique des infusés des feuilles d'*I. Viscosa* sont regroupés dans le Tableau.3.7, Tableau.3.8 et Tableau.3.9.

16 groupes chimiques ont été testés dans ce travail. Les images présentant les tests effectués sont données en annexe 3.

Les résultats du Tableau.3.7, montrent que la composition phyto-chimique des feuilles d'*I. Viscosa* est identique pour les deux régions. Les résultats indiquent que les feuilles de la plante des deux régions, sont riches en polyphénols, flavonoïdes, tanins, glycosides cardiaques, terpenoïdes, quinones libres, coumarines, stérols et triterpènes ainsi qu'en coumarines et sont pauvres en anthocyanes et leucoanthocyanes.

Tableau.3.7 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-méthanoïque.

Identification Pour l'extrait hydro-méthanoïque	Région Iferrhounene		Région Ouadhias	
	Présence (+) Absence (-)	Couleur/Aspect	Présence (+) Absence (-)	Couleur/Aspect
Polyphénols	+	Vert foncé	+	Vert noirâtre
Flavonoïdes	+	Marron orange	+	Marron orange
Tanins	+	Vert foncé	+	Vert foncé
Glycosides cardiaques	+	Brun rougeâtre	+	Brun rougeâtre
Anthocyanes	-	Vert clair	-	Vert clair
Terpènoïdes	+	Anneau rouge- brunâtre	+	Anneau rouge- brunâtre
Quinones libres	+	Rouge	+	Rouge noirâtre
Leuco anthocyanes	-	Jaune	-	Jaune
Stérols et triterpènes	+	Vert noirâtre	+	Vert foncé
Coumarines	+	Faible fluorescence à 366 nm	+	Faible fluorescence à 366 nm

Alors que pour l'extrait hydro-éthanolique (Tableau.3.8), les feuilles d'*I. Viscosa* pour les deux régions, sont riches en polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols et triterpènes et pauvres en anthocyanes et leucoanthocyanes ainsi qu'en quinones libres.

Les glycosides cardiaques et les terpènoïdes, sont mis en évidence uniquement dans l'extrait de la plante de la région d'Iferrhounene.

Tableau.3.8 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-éthanolique.

Identification pour l'extrait hydro-éthanolique	Région Iferhounene		Région Ouadhias	
	Présence (+) ou Absence (-)	Couleur/Aspect	Présence (+) ou Absence (-)	Couleur/Aspect
Polyphénols	+	Vert foncé	+	Vert noirâtre
Flavonoïdes	+	Rose clair	+	Marron orange
Tanins	+	Vert foncé	+	Vert foncé
Glycosides cardiaques	+	Brun rougeâtre	-	Vert clair
Anthocyanes	-	Vert foncé	-	Vert foncé
Terpénoides	+	Anneau rouge-brunâtre	-	Anneau vert foncé
Quinones libres	-	Vert noirâtre	-	Vert foncé
Leuco anthocyanes	-	Vert clair	-	Jaune
Stérols et triterpènes	+	Vert foncé	+	Vert foncé
Coumarines	+	Faible fluorescence à 366 nm	+	Faible fluorescence à 366 nm

Le Tableau.3.9, montre que pour les deux régions, les feuilles d'*I. Viscosa*, sont riches en saponines, dérivés anthracéniques libres, O-hétérosides à génine réduite et en -C-Hétéroside. Mais pauvres en alcaloïdes et enanthraquinones.

Tableau.3.9 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles.

Identification	Région Iferhounene		Région Ouadhias	
	Présence	Couleur/Aspect	Présence	Couleur/Aspect
Saponines (infusion de la plante)	+	Présence de mousse	+	Présence de mousse
Dérives anthracéniques libres (utilisation de la poudre)	+	Rouge	+	Rouge
Alcaloïdes (utilisation de la poudre)	-	Pas de précipité jaune	-	Pas de précipité jaune
Anthraquinones (utilisation de l'hydrolysate)	-	Vert clair	-	Pas de coloration rouge
O-hétérosides à génine réduite (utilisation de l'hydrolysate)	+	Rouge noirâtre	+	Rouge noirâtre
-C-Hétéroside (utilisation de l'hydrolysate)	+	Rouge noirâtre	+	Rouge noirâtre

D'après les résultats obtenus, nous constatons qu'*Inula Viscosa* présente une diversité moléculaire en métabolites secondaires.

Ce que confirment les travaux de Deghdak., Zaiter, (2014), réalisés sur les feuilles de la même espèce, récoltées dans l'espace universitaire Mentouri Constantine, en Mars 2014. Ça a révélé la présence des tanins et saponines chez *I. Viscosa*.

Pour le test d'identification des alcaloïdes, nous ne nous les avons pas détectés dans notre plante, contrairement à Boukemaya., Messaoud (2016), Cette différence peut être liée aux protocoles expérimentaux utilisés.

### 3.3.1. Rendement des extraits

Deux solvants de polarité croissante ont été employés pour l'extraction des composés phénoliques, à partir de la poudre d'*I. Viscosa*. À savoir l'éthanol et le méthanol. Ces deux solvants sont additionnés à 30% d'eau distillée. Les résultats des rendements sont illustrés dans le tableau.3.10 et la Fig.3.5.

Tableau.3.10 : Rendements des extraits polyphénols par différents solvants.

Solvant d'extraction	Macération (m = 20 g) (Région Iferrhounene)		Macération (m = 20 g) (Région Ouadhias)	
	Masse extraite (g)	Rendement (%)	Masse extraite (g)	Rendements (%)
Méthanol à 50°C	5.10	25.55	4.87	24.35
Ethanol à 70°C	3.53	17.65	2.59	12.95

Les résultats décrits dans ce tableau, révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. Le solvant méthanol à 70% avec un ratio de 1/10 donne un meilleur rendement pour les deux régions, 25.55% pour la région d'Iferhounene et 24.35% pour la région de Ouadhias, comparés aux rendements obtenus pour le solvant éthanolique 17.65% (Iferhounene) et 12.95% (Ouadhias).

Les rendements d'extraction par le solvant éthanolique trouvés, sont inférieurs à ceux de Boukemaya., Messaoudi, 2016 (35% et 34.55%). Cette différence serait due au protocole d'extraction suivi ainsi de la nature de la matière végétale, cette dernière étant influencée par les facteurs environnementaux (Smith et al, 2001).

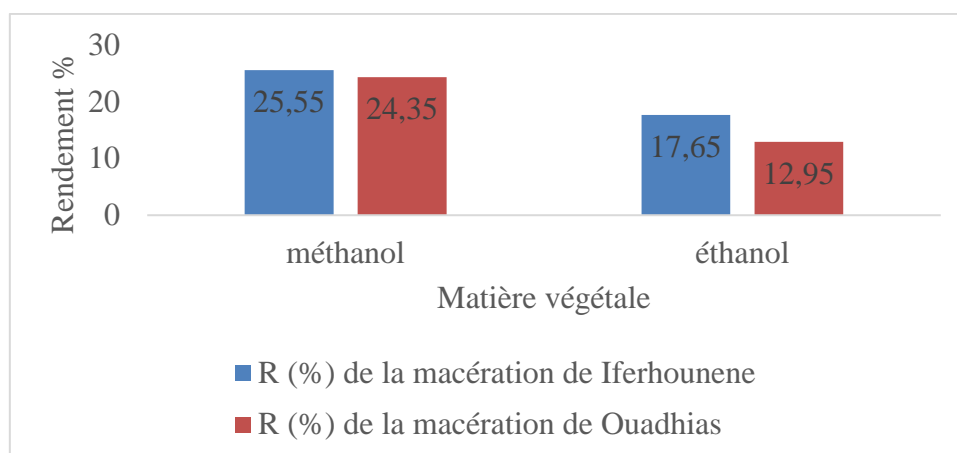


Fig.3.5 : Rendements des extraits polyphénols *d'I. Viscosa* par le méthanol et l'éthanol pour les deux régions.

La matière végétale dépend de l'organe récolté ; de la période ainsi qu'au type de la récolte. Elle est étroitement liée aux facteurs climatiques du milieu (pluviométrie, altitude, latitude et la nature du sol), le mode de stockage et le conditionnement (Lee. K et al, 2003). Aussi l'addition de 30 % d'eau distillée au méthanol a augmenté de façon remarquable le pouvoir d'extraction.

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces pour extraire les polyphénols. L'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. La supériorité des solvants mixtes serait due à l'augmentation de la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. Le méthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux (Bourgou. S et al, 2017).

### 3.3.2. Analyse qualitative des polyphénols par HPLC

Les solutions témoins utilisées pour l'identification des polyphénols *d'I. Viscosa* des deux régions et leurs temps de rétentions sont regroupées dans le Tableau.3.11.

Tableau.3.11 : Standard et temps de rétentions utilisés pour l'analyse des polyphénols par HPLC.

Solvant	N° du pic	Temps de rétention (min)	Intensité du signal mV	Type du standard
Ethanol Ouadhias	1	24.89	20.90	Acide cinnamique
Méthanol Ouadhias	2	18.16	3230	Acide coumarique

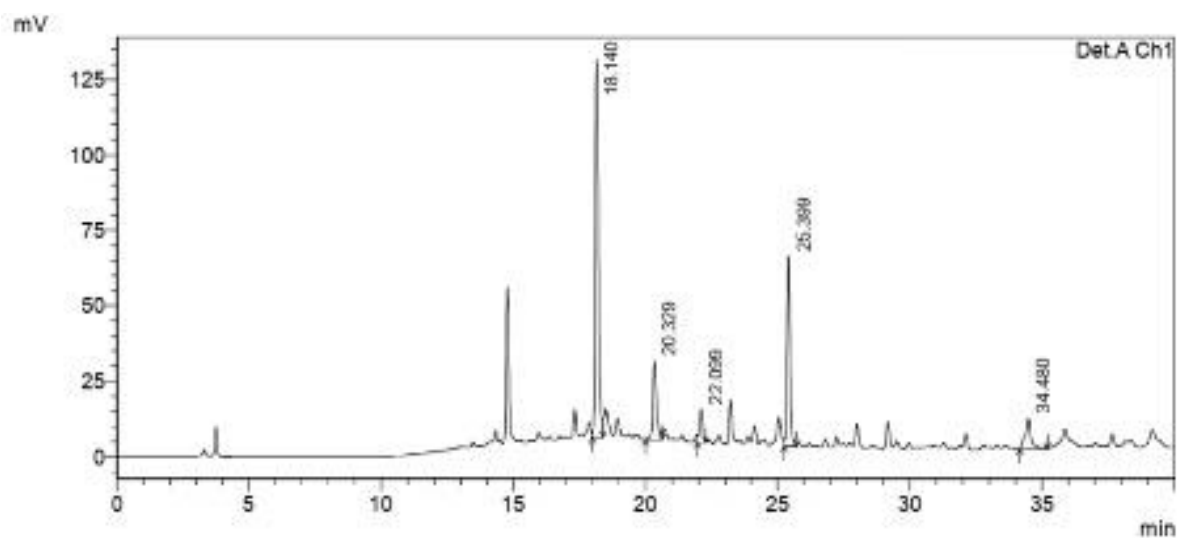
Ethanol Iferhounene	3	18.14	137.48	Acide coumarique
Méthanol Iferhounene	4	18.16	1746	Acide coumarique

L'analyse HPLC effectuée sur les extraits, hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique des feuilles sèches d'*I. Viscosa* (polyphénols), récoltées au niveau des deux régions Iferhounene et Ouadhias, à une longueur d'onde de 280 nm, a mis en évidence 2 pics intenses (Fig.3.6 et Fig.3.7).

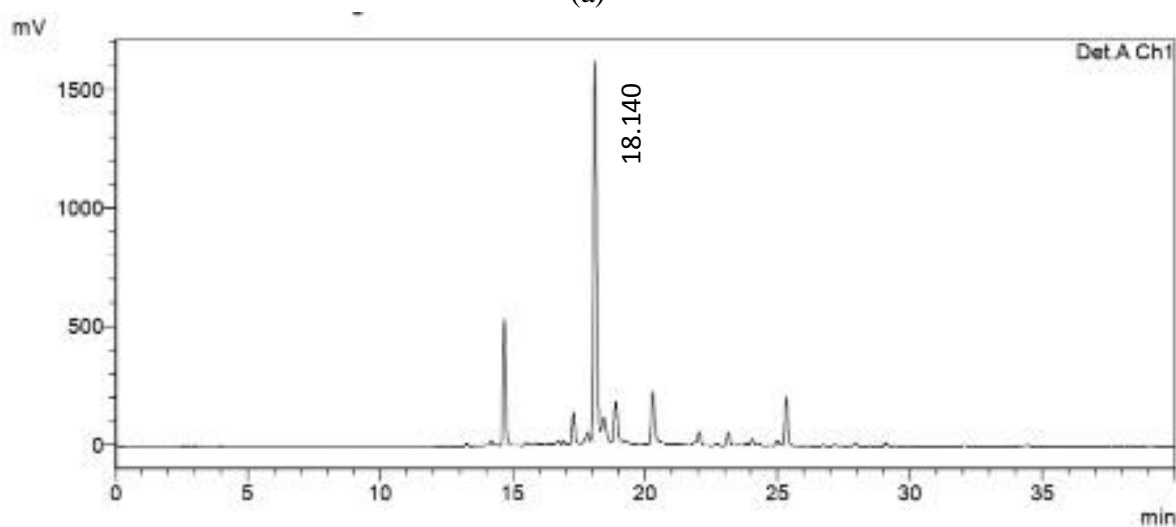
Le premier pic correspond à l'acide cinnamique (étalon des tanins) vient confirmer l'existence des tanins et le deuxième correspond à l'acide coumarique (étalon utilisé pour la caractérisation des coumarines et flavonoïdes) témoignant la présence des coumarines et flavonoïdes.

Les deux extraits hydro-méthanoïques des deux régions, ont mis en évidence de forte intensité du signal pour les pics correspondant à l'acide coummarique, à noter qu'une meilleure séparation de l'acide coummarique a été enregistrée dans l'extrait hydro-méthanoïque Ouadhias.

Nous remarquons pour les standards utilisés : l'acide gallique a été élué à 10,12 min et l'acide caféïque à 16,33 min et aucun pic n'a été détecté à ces temps sur l'ensemble des chromatogrammes.

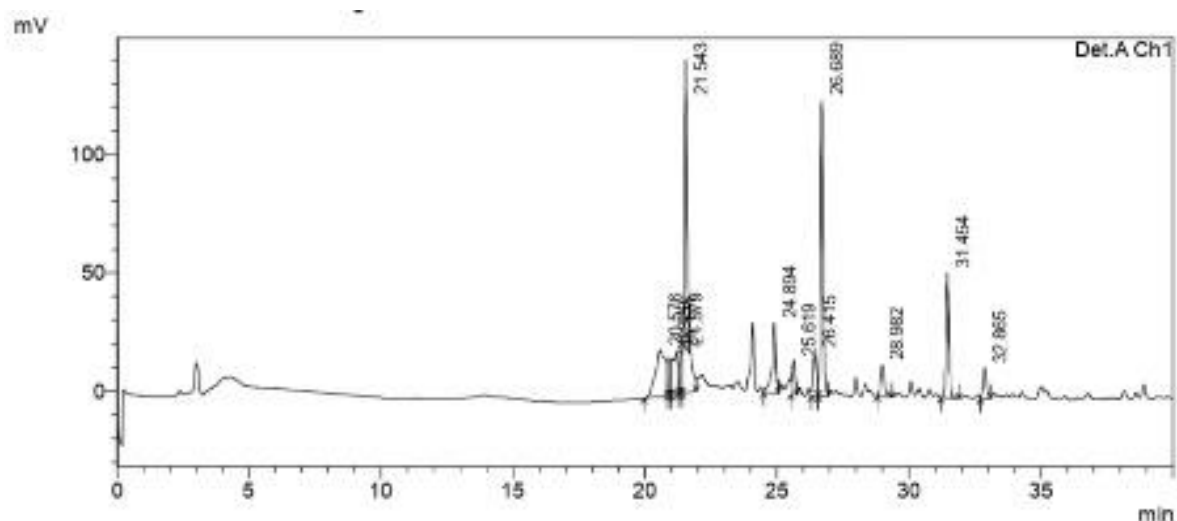


(a)

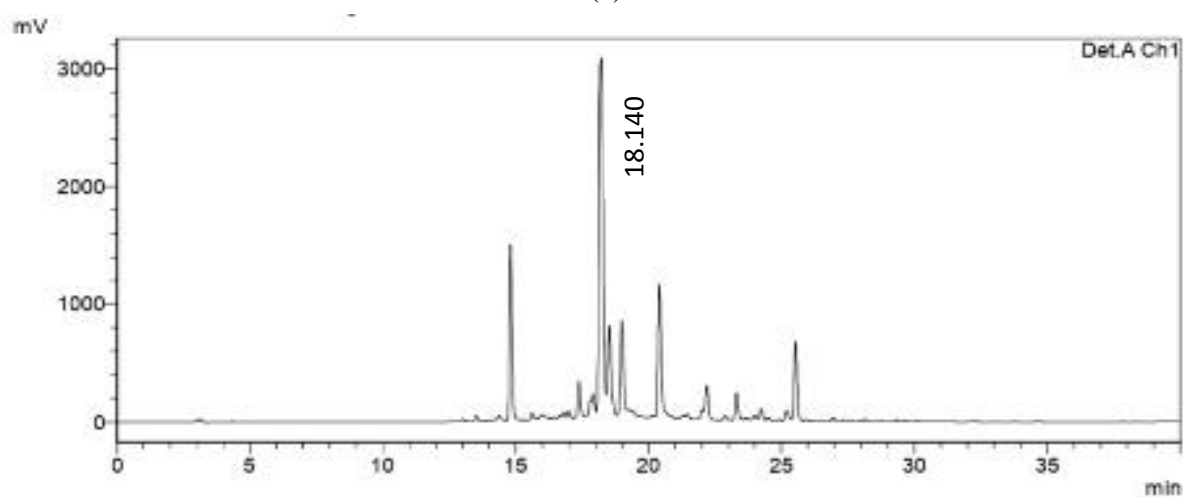


(b)

Fig.3.6 : Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles *d'Inula Viscosa* (Iferhounene) : (a) extrait hydro-éthanolique, (b) extrait hydro-méthanoïque



(c)



(d)

Fig.3.7 : Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles *d'Inula Viscosa* (Ouadhias) : (c) extrait hydro-éthanolique, (d) extrait hydro- méthanoïque

Il n'est pas possible d'identifier l'ensemble des constituants des extraits, étant donné le manque de substances étalons, mais nous pouvons tirer plusieurs conclusions à partir des chromatogrammes, et ce par simple comparaison, nous citons :

Le pouvoir d'extraction de l'éthanol et du méthanol, ne semble pas être le même. En effet les compositions des deux extraits hydroalcooliques sont différentes pour les deux échantillons de Ouadhias et Iferhounene, l'éthanol extrait plus de composés. Cette différence serait due à une meilleure solubilité des composés organique dans l'éthanol. Le méthanol extrait que des composés dans la zone de polarité intermédiaire (tr : entre 15 et 25 min).

- L'éthanol extrait, en plus des composés de polarité intermédiaire, des composés polaires (tr faible) et des composés relativement moins polaires (tr > 25 min)

Nous n'avons pas effectué de comparaison avec des résultats antérieurs en raison de l'absence des travaux traitant l'analyse des polyphénols par HPLC pour cette plante.

### 3.4. Formulation pharmaceutique

#### 3.4.1. Contrôle qualité des crèmes antiseptiques

Les résultats obtenus du contrôle qualité des crèmes formulées à base d'extrait hydro-méthanoïque, hydro-éthanolique et de l'HE (5%), sont consignés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Contrôle qualité des crèmes formulées.

Crème	Crème test (1) à 5%	Crème (2) à base HE <i>d'I. Viscosa</i> à 5%	Crème (3) à base d'extrait hydro-éthanolique à 5%	Crème (4) à base d'extrait hydro-méthanoïque à 5%	Crème (5) à base de saveur du menthol à 5%
Mesure de pH	5.5	6			
Test de la goutte	-L'échantillon s'est dispersé dans la phase aqueuse mais pas dans la phase grasse. Conclusion : émulsion de type H/E. (Annexe 5, Fig.A.2).				
Test de centrifugation	- à 6000tours/min pendant 30 min, pas de séparation de phase. Conclusion : sa stabilité peut aller au-delà d'une année. (Annexe 5, Fig.A.3).				
Examen microscopique	-Bonne dispersion ; -Taille des gouttelettes : homogènes. Les bulles en noir (crème 1, 2 et 4) sont des bulles d'air, c'est lié à l'homogénéité, 1 et 4 ont plus de bulles d'air, causées lors de la formulation ; Les bulles en blanc : représentent l'extrait d'HE (Crème 2) ; (Crème 2 et crème 3) : sont bien plus stables et bien homogénéisées. (Annexe 5, Fig.A.5).				
Examen macroscopique	-couleur et odeur : prend la couleur et l'odeur de l'extrait ; une couleur blanche pour la crème 1, 2 et 5 et jaune pour la crème 3 et 4. - Homogénéité : - bonne consistance. - Pas collante - Test d'étalement : - absence d'agrégats visible à l'œil nu. -Bonne diffusion à travers la Peau. (Annexe 5, Fig.A.1).				

### 3.5. Etude antibactérienne

Dans cette partie, nous avons évalué in vitro l'activité antimicrobienne de l'HE et des extraits hydro-éthanolique et hydro-méthanoïque de *I. Viscosa* de la région Ouadhias sur quatre souches bactériennes. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.13. Des photos de la lecture de la zone d'inhibition après 24h d'incubation sont données en annexe 6 Fig.A.1.

En raison du manque des extraits de la plante de la région Iferhounene, nous n'avons pas pu faire l'étude antibactérienne sur cette dernière.

Tableau.3.13 : Diamètre des zones d'inhibition des différents extraits des feuilles d'*Inula Viscosa*.

Souches bactériennes	Diamètre de zone d'inhibition (mm)				
	Antibiotique AZTREONAM. (ATM 30µg)	HE	Ethanol 25%	Méthanol 25%	DMSO
<i>Escherichia-coli</i> Gram - (Boite A et E, respectivement)	44	6	0	0	-
	40	6	7	7	-
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> Gram - (Boite B et F, respectivement)	25	8	0	0	-
	25	6	0	0	-
<i>Staphylococcus Aureus</i> Gram + (Boite D et H, respectivement)	00	14	6	9	-
	00	12	7	6	-
<i>Bacillus Subilis</i> Gram + (Boite C et G, respesctivement)	0	18	10	6	-
	0	17	10	11	-

Les résultats consignés dans le Tableau 3.13, montrent que le DMSO utilisé pour la dissolution de l'HE n'a montré aucun effet antibactérien sur les souches testées, (-) : témoin négatif.

L'HE des feuilles d'*I. Viscosa*, présentent une moyenne activité inhibitrice sur la souche *Bacillus Subilis* avec un diamètre d'inhibition (18-17 mm) et une légère activité inhibitrice sur la souche *Staphylococcus Aureus* (14-12 mm). Il n'y a pas d'inhibition pour les extraits par

solvant concernant ces deux souches, l'extrait hydro-méthanoïque avec un diamètre 11 mm, présente une légère activité inhibitrice sur la souche *Bacillus Subilis*.

*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, comptent des diamètres d'inhibition moins de 10 mm, il avère que l'HE et les extraits par solvant n'ont pas une activité antimicrobienne significative vis-à-vis de ces souches.

Nous remarquons également que l'antibiotique utilisé, présente une très forte activité inhibitrice sur la souche *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition (44-40 mm) et qui est remarquable comparé au diamètre d'inhibition (25-25 mm) déterminé vis-à-vis de la souche *Pseudomonas Aeruginosa*. Néanmoins, l'antibiotique n'a enregistré aucune zone d'inhibition pour les deux autres souches, ce qui montre que les souches *Staphylococcus Aureus* et *Bacillus Subilis* sont résistantes à cet antibiotique.

En comparant nos résultats avec ceux de Boukemaya., Messaoudi, (2016), l'extrait éthanolique brut de la région Draâ El Mizan, est plus actif sur la souche *Staphylococcus aureus* par rapport à celui de la région de Cap Djenet. Par contre, il n'a aucun effet vis-à-vis de *E. coli* et *Pseudomonas Aeruginosa*.

En revanche, les travaux de Ramli, (2013), affirment qu'*E. coli* présente une résistance envers l'extrait hydro-alcoolique (méthanol-eau) lyophilisé d'*I. Viscosa*, donc ces bactéries sont résistantes aux molécules contenues dans l'extrait hydro-alcoolique d'*I. viscosa*.

D'après Abdoune, (2012) et Benhammou, (2006), l'extrait phénolique de cette plante n'a aucun effet sur *Pseudomonas Aeruginosa* mais elle est légèrement inhibitrice sur *E. coli* et fortement inhibitrice sur *Staphylococcus aureus*.

Les résultats trouvés par Laghrifi et al, (2013), montrent que l'extrait hydro-méthanoïque et hydro-éthanolique d'*I. Viscosa* ont un fort pouvoir antibactérien contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif dont *E. coli*. L'extrait méthanoïque est alors plus actif contre toutes les souches bactériennes testées. En outre, ces résultats indiquent également que l'extrait hydro-éthanolique s'est prononcé antibactérien plus que l'extrait aqueux. Les travaux de Mohamedi, 2006 et Smith, 2001, confirment que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif, ceci peut s'expliquer par la différence de la structure de la paroi constituant les différentes bactéries Gram+ et Gram-. La paroi est dotée d'une membrane externe, la présence d'une couche de lipopolysaccharie LPS pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule. Pour l'HE, une étude a été faite par Benseguni., Tounsi, (2001) et Bachir et al, (2015), soulignant aucun effet de l'HE d'*I. Viscosa* sur *E. coli* qui est résistante, mais une forte sensibilité de *Staphylococcus aureus*.

## **Conclusion et perspectives**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail porte sur l'étude phyto-chimique ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des composés bioactifs présents dans l'huile essentielle et les extraits, hydro-éthanolique et hydro-méthanoïque des feuilles de *Inula visqueuse* (*Inula Viscosa* L) appartenant à la famille des Asteraceae, dans deux régions de collecte : (Soumeur) Iferhounene et Ouadhias, wilaya de Tizi-Ouzou.

Les résultats du taux d'humidité des feuilles d'*Inula Viscosa*, montrent des valeurs proches pour les deux régions : elles sont de 78.59 % pour Iferhounene et 77.02 % pour Ouadhias.

L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation indique des rendements faibles de l'ordre de 0.13% à 0.19% Iferhounene et Ouadhias respectivement.

L'analyse qualitative et quantitative des différents constituants des huiles essentielles utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) et leurs propriétés physico-chimiques définissent l'identité de l'essence, ces données permettront de contrôler la qualité de l'essence afin de l'insérer dans la pharmacopée. Cette analyse nous a permis d'identifier 73 composés représentant 31.291% de la composition totale de l'HE des feuilles d'*I. Viscosa* pour la région d'Iferhounene et 43.856% pour celle de la région de Ouadhias. Les résultats indiquent que le composé majoritairement présent dans ces dernières est le caryophyllène oxide avec un pourcentage de 3.943% (Iferhounene) et de 7.872% (Ouadhias).

De plus, l'étude phyto-chimique des feuilles d'*Inula Viscosa* des deux régions, avec l'analyse qualitative de ses différents constituants par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires tels que : polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponines, dérivés anthracéniques libres, O-hétérosides à génine réduite et en -C-Hétéroside, glycosides cardiaques, quinones libres, coumarines, stéroïdes et triterpènes.

L'extraction des polyphénols par macération à froid, ont donné de meilleurs rendements pour le solvant méthanol à 70% et ce pour les deux régions, 25.55% pour la région d'Iferhounene et 24.35% pour la région de Ouadhias, comparés aux rendements obtenus pour le solvant éthanolique 17.65% (Iferhounene) et 12.95% (Ouadhias).

Au cours de cette étude, nous avons réalisé également un test antibactérien vis-à-vis de quatre souche bactériennes, à savoir : *Escherchia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Subilis*. Les résultats ont démontré l'effet inhibiteur de l'HE vis-à-vis de *Bacillus Subilis* (ZI= 18-17 mm) et *Staphylococcus Aureus* (ZI= 14-12 mm). Pour les extraits par solvant, l'extrait hydro-méthanoïque avec un diamètre 11mm, présente une légère activité inhibitrice sur la souche *Bacillus Subilis*.

Nous avons opté pour une préparation et contrôle qualité d'une crème industrielle à base des extraits de la plante. Par l'ajout de réactifs adéquats, nous avons réalisé une synthèse chimique du menthol. Ce dernier est mélangé à la crème formulée lui conférant ainsi une saveur agréable.

Il serait intéressant pour la continuité de ce travail de :

- ✓ Procéder à l'extraction de l'HE par d'autres techniques pour déterminer la méthode optimale qui donne le meilleur rendement en huiles essentielles ;
- ✓ Réaliser des tests antimicrobiens sur une large gamme de microorganismes ;
- ✓ Isoler et identifier les molécules bioactives de l'HE et polyphénols ;
- ✓ Evaluer d'autres activités comme : antidiabétique, anticancéreuse, anti-inflammatoire...etc.

# **Références bibliographiques**

## A

- **AFNOR. 2000.** Association française de Normalisation. Norme Française : les huiles essentielles, monographie relatives aux huiles essentielles, Ed. Afnor, Paris, p 663.
- **ABDOUNE Yamina. 2012** Contribution à l'extraction des huiles essentielles de l'inule visqueuse algérienne par diverses méthodes, études de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Magister en Génie des Procédés. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.
- **ADAM. K et al. 1998.** Antifungal Activities of *Origanumvulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 46 : 1739-1745.
- **AKLIL. A., et BANDOUE. A. 2017.** Evaluation des activités biologiques des extraits d'une Asteraceae. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée. Université de Boumerdes., p (20-50).
- **AI-DISSI. N.M., SALHAB. K.S., AI-HAJJ, H.A. 2001.** Effect of *Inula viscosa* le extracts on abortion and implantation in rats. Journal of Ethnopharmacology'117-121.
- **AKROUM. S. 2011.** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie.

## B

- **BACHIR. R. G., NOUR. H. 2015.** Antibactérien and Antioxydant Activities of Essential Oil of *Inula viscosa* L. from North West of Alger. Département of Biology, University of Mascara, Algeria.
- **BAKKARA. F.A., BENHAMMOU. N et PANOSKA., T.k. 2008.** Biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *Inula viscosa* form the Tlemcen region of Algeria advances in food sciences, vol 30; 3 (132-139).
- **BARTELS. A. 1997.** Guide des pentes du bassin méditerranéen. Ed Eugenuelmer, Paris, p172.
- **BAYDAR. H., FEHMI. G. 1998.** « Antalya Dogal Florasında Bal Arısı (*Apis mellifera*) nın Polen Toplama Aktivitesi, Polen Tercihi ve Farklı Polen Tiplerinin Morfolojik ve Kalite Özellikleri». Journal of Agriculture and Forestry, 475-482.
- **BEN AMOR. N.A. 2013.** Extraction et valorisation des huiles essentielles de L'*Inula viscosa* L. Mémoire de Master en Chimie. Université d'Ouargla., p (12).

- **BENAYAD. N. 2008.** « Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées » thèse doctorat, Ouargla.
- **BENHAMMOU et ATIK BEKKARA. 2005.** Contribution à l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*. Mémoire de Master Laboratoire de produits naturels, Université Abou Bekr Belkaid BP 19, Imama Tlemcen.
- **BENHAMMOU. N. 2006.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen Magister en biologie, université abou bekr belkajd, Faculté des sciences, pp. 1-145.
- **BENGUERBA. A. 2008.** Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides* L. Thèse de magister. Université Mentouri-Constantine, Faculté des sciences exactes.
- **BENSEGUENI., TOUNSI. 2001.** Etude in vitro de l'effet antibactérien et antiphangique de : *Inula viscosa*-*Lawsonia inermnis*- *Asphodelus microcarpus*- *Aloe vera*- *Juniperus oxycedrus*, Thèse de Magistère en médecine vétérinaire. Faculté des sciences, Université de Constantine.
- **BENYAHIA. A. 2014.** Contribution à l'étude phytochimique et activité biologique de deux plantes médicinales *Inula viscosa* et *Inula montana*. Master en chimie ; Molécule Bioactive synthèses et application. Tlemcen ; Université Aboubakr Belkaid, p53.
- **BETA. T., NAM. S., DEXTER. J.E., SAPIRSTEIN. H.D. 2005.** Cereal chemistry. Phenolics content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem*, 82:390 -393.
- **BONNIER. G. 1990.** La grande flore. Ed Belin : 517 .565. 568.
- **BOUCHELTA. A., BOUGHADAD. A., Blenzar. A. 2005.** Effets biocides des alcaldides; des saponosides, et des flavondides extraits de *Capsicumfrutescens* L. (*Solanaceae*) sur *Bemisiatabaci* (Gennadius) (*Homoptera* : *Aleyrodidae*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 259.
- **BOUHARB. H., EI BADAOUI. K., ZAIR. T., EI AMRI. J., CHAKIR. S., ALAOU. T. 2015.** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78 :6685-6693.

- **BOUKEMAYA. F., MESSAOUDI. F. 2016.** Etude phyto-chimique de la plante *Inula viscosa* L. Ait. (Asteraceae) et évaluation des activités insecticide et antimicrobienne de son extrait éthanolique brut. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée. Université de Boumerdés, pp 39 ; 40 ; 43 ; 48.
- **BOUMAZA. D. 2011.** Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : *Inula viscosa* *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran. Mémoire de Magister en Chimie Organique, Université d'Oran, Faculté des Sciences. Département de chimie, pp.1-78.
- **BOURGOU. S., SERAIRI BEJJ. R., MEDINI. F., KSOURI. R. 2017.** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. JOURNAL OF NEW SCIENCES, vol 28, EISSN 2286-5314.
- **BOUYAHIA. A., ET-TOUYS. A., KHOUCHLAA. A., EL-BAABOUA. A., BENJOUAD. A AMZAZI. S., DAKKA. N., BAKRI. Y. 2018.** Notes ethnobotaniques et phytopharmacologiques sur *Inula viscosa* Lavoisier SAS 017.
- **BOYLE. W. 1995.** Spices and essential oils as perspectives. American Performer Essential Oil Review, 66: 25-28.
- **BURT. S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology.

## C

- **CHALCHAT. J.K., CARRY. L. P., MENUT. C., LAMATY. G., MALHURET. R., Chopineau. J. 1997.** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. J. Essent. Oil Res.
- **Chaouche. T.M. 2014.** Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou- Bakr- Belkaid. Tlemcen.
- **CHARPENTIER. P et al. 2006.** « Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier » le cahier des techniques de l'Inra, pp. 9-82.
- **CHOUITAH. O. 2012.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat. Université Ahmed ben bella. Oran. Algérie.

**D**

- **DAHLIA. M. 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, vol 23 (2): 174-181.
- **DESCHEPPER. R. 2017.** «Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie», thèse doctorat, Marseille.
- **DEGHDAK. H et ZAITER. R. 2014.** Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale algérienne *Inula Viscosa*. Mémoire de Master en Toxicologie et santé Université de Constantine 1, pp 46.
- **DEGRYSE. A et al. 2008.** « Risque et bénéfice possibles des HE Ingénieur du Génie Sanitaire » thèse doctorat, Rennes.
- **DUPONT. F., GUIGNARD. J. L. 2007.** Abrèges botanique systématique moléculaire. 14<sup>ème</sup> édition révisée, Masson.

**E**

- **ENGLOBIN. M. 2011.** « Essence et HE précaution d'emplois et conseils d'utilisation » Rapport; Centre de formation en aromathérapie.
- **EVANS., W. CHARLES. 1989.** « Trease and Evan's Textbook of Pharmacognosy » 13e éd., vol. 13, London, p. 546.

**F**

- **FAUCHERE. J.L. Avril. 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses, Paris. p 365.
- **FOURNIER. P. 1947.** Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. Lechevalier. Tome 1 : 176-178.

**G**

- **GABRIEL. W. 2005.** « How stress selects for reversible phenotypic plasticity » *Journal of Evolutionary Biology*.

**H**

- **Halimi A, 1997.** Les plantes médicinales en Algérie. P .158-159.
- **HAOUI. IE., DERRICHE. R., MADANIL., OUKAIZ. 2015.** Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L) Aiton Arabian Journal of chemistry.

- **HERNANDEZ OCHOA. L.R. 2005.** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

## J

- **JEAN. B. 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales., 4eme édition éd., Eds Tec & Doc.

## K

- **K.H.C. BASER, 2009.** Handbook of essential oils: science, technology and applications, 1er edition, CRC Press.
- **KHALIL. E.A., AFIFI. F.U., AI-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 129: 104-112.
- **KHEYAR. N. 2009.** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa* L, *Salvia officinalis* L et *Laurus nobilis* L. Chimique Magister en Biologie Université A. Mira de Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pp 1-100.

## L

- **LAGHRIFI. K., El Idrissi. M., Makoudi. Y. & Alnamer. R. 2013.** In vitro antibacterial activity of the methanolic and ethanolic extract of *Inula viscosa* used in Moroccan traditional medicine. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 2:3963-3976.
- **Lee K. W., Kim Y., Lee H.J et Lee C.Y. 2003.** Cocoa Has More PHENOLIC phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J. Agric. Food Chem.,51:7292-7295.

## M

- **MALECKI. M. 2005.** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech, pp 9-27.
- **MOROHO. A. 2008.** «Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milneredheat (*rubiaceae*) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains» Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, p 334.

- **MOUFFOK. S. 2011.** Etude des métabolites secondaires de *Centeurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae). Mémoire de Magister en chimie organique, Université Hadj Lakhdar, Faculté des sciences, Batna, pp. 1-141.

## P

- **PIERRON. C. 2014.** « Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs », thèse doctorat, Lorraine.
- **PIOCHON. M. 2008.** « Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthés », thèse doctorat, Québec.
- **PAROLIN. P., SCOTTA. M.1 et BRESCH. C. 2014.** Biology of *Dittrichia viscosa* a Mediterranean, ruderal plant, international Journal of experimental Botany ;83(251-261).

## Q

- **QUEZEL. P., SANTA. S. 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS-Paris France; 1-2.

## R

- **RAMLI. Bakhta. 2013.** Extraction des flavonoïdes de la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran et mise en évidence de l'activité microbienne. Mémoire de magister. Université d'Oran. Algérie.
- **REZAIRE. A. 2012.** Activité antioxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. France.
- **ROUESSAC. F., ROUESSAC. A., BROOKS. S. 2007.** Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, p.31.

## S

- **STEIN. S. E. 2008.** « NIST Standard Reference Database 1A », manuel user's.
- **SEBAL. M et BOUDALIM. M. 2012.** La phytothérapie entre la confiance et la méfiance. Mémoire professionnel. Institut de formation paramédical CHETTIA.

- **SMITH-PALMER. A., STEWART. J., FEYEL. L. 2001.** The potential application of plants essential oils as natural food preservative in soft cheese Food Microbiology .18 :463

## W

- **WILKINSON. J.M., AHMAD. I., AQIL. F., OWAIS. M. 2006.** Methods for testing the antimicrobial activity of extracts: 157-165; In“Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs”, édition., WILEY-VCH :405.

## Z

- **ZEGGWAGH. N.A., M-L. OUAHIDI. A., LEMHADRI., M. EDDOUKS. J., ETHNO. 2006.** Ethnopharmacological Study and Antifungal Activity of Three Plants (Asteraceae Family). Journal of Ethnopharmacology, vol.108. p 223–227.

## Sites internet

- **FERHAT. M. 2009.** Article sur les huiles essentielles [en ligne]. [Consulté le 10/04/2021]. <[http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE\\_fr.pdf](http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE_fr.pdf)>.
- **HPLC Principe et appareillage. 2010.** Ressource pédagogique- Biochimie et Bio moléculaire [en ligne]. [Consulté le 18/08/2021]. <<https://sms-bse-bgb.discip.accaen.fr/spip.php?article475>>.
- « **Toxicité des huiles essentielles** » [en ligne]. [Consulté le 14/04/2]. <[https://fr.slideshare.net/ananthvinothan/ananth-vinothan?next\\_slideshow=1](https://fr.slideshare.net/ananthvinothan/ananth-vinothan?next_slideshow=1)>.
- « **Pubchem** » [en ligne]. [Consulté le 05/09/2021]. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caryophyllene-oxide>>.
- « **Pubmed** »<sup>1</sup>.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties [en ligne]. [Consulté le 05/09/2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27696789/>>.
- « **Pubmed** »<sup>2</sup>. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization [en ligne]. [Consulté le 05/09/2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16226832/>>.

# **Annexes**

### Annexe 1 : Matériel et méthodes

L'ensemble des réactifs et solvants utilisés ainsi que leur formule chimique, pureté et leurs caractéristiques sont regroupés dans le Tableau A.1.

Tableau A.1 : propriétés des réactifs et solvants utilisés.

Réactifs et solvant	Nom chimique	Spécification	Caractéristiques
FeCl <sub>3</sub> (6H <sub>2</sub> O)	Chlorure ferrique hexa hydraté	Poids moléculaire : 270.30 g/mol ; Densité relative : environ 1.8 ; Point de fusion : 37°C ; Point d'ébullition : 280-285°C - lit ; Essai : 97.0-102.0% fecl3.-6h2O.	Aspect : cristaux ou poudre granulés jaunâtres ; Solubilité : très soluble dans l'eau et dans l'éthanol (96%), librement soluble dans le glycérol.
HCL	Acide chlorhydrique	Masse molaire : 36,461 g/mol ; Pka : -6,3 ; T° de fusion : -30 °C, solution à 37 % ; T° ébullition : 48 °C, 38 % HCl ; Masse volumique : environ 1,19 g cm <sup>-3</sup> à 20 °C (solution à 37 %) ; Viscosité dynamique : 1,53 mPa s à 25 °C ;	Transparent, très légèrement jaunâtre.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique	Masse molaire : 98,08 g/mol ; - densité (20°C) : 1.840 g/cm <sup>3</sup> ; T° ébullition : 64.05 °C ; T° de fusion : 14-10°C ; Pression de vapeur saturante (25°) : 0.01 hPa ; Température de stockage: Température ambiante.	Liquide hygroscopique, huileux, incolore, inodore, toxique.
Copeaux Mg	Copeaux de magnésium	Masse atomique : 24,305 u ; Densité : 1,738 g/cm <sup>3</sup> ; T° de fusion : 650 °C ; T° ébullition : 1 090 °C ; Energie de fusion : 8,954 kJ·mol <sup>-1</sup> ; Energie de vaporisation : 127,40 kJ·mol <sup>-1</sup> ; Pression de vapeur : 361 Pa ; Chaleur massique : 1 825 J·kg <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ;	-Solubilité : soluble dans le méthanol (ou alcool méthylique), les acides dilués, les solutions de sels d'ammoniac ; le magnésium, est un métal d'aspect argenté ou blanc ; sous forme de copeau s'enflamme aisément à l'air libre.
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniaque	Poids moléculaire: AMMONIA SOLUTION 30% Extra Pure ; Poids moléculaire : 35.05g/mol ; pH : 11.7 ; T° de fusion : -60 °C ; T° ébullition : 38 100 °C ; Température d'auto-	Solvant portique, toxique et inflammable ; Solubilité : peu soluble dans l'eau.

		inflammation: 6510 °C ; Pression de vapeur : 153 hPa à 20 °C ; Densité relative de vapeur à 20 °C : 1.21 .	
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Anhydride acétique	Masse molaire : 102.09 g/mol ; T° de fusion : 73 °C ; T° ébullition : 139 °C ; Pression de vapeur saturante : 5 hPa (20 °C) ; Température d'auto-inflammation: 316 °C.	Liquide incolore, très mobile, d'odeur âcre ; Solubilité : soluble dans l'éthanol, l'acétone, le chloroforme, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le DMSO.
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme	Masse molaire : 119,38 g/mol ; Point d'ébullition : 60-62°C ; Point de fusion : -63°C ; Pression de vapeur saturante : 210 hPa (25°C) ; Densité (20°C) : 1.48 g/cm <sup>3</sup> ;	Liquide incolore, volatil, d'odeur caractéristique ; Solubilité : peu soluble dans l'eau, éthanol, éther, et le benzène et soluble dans l'acétone.
Réactif de Mayer	/	Composition : Chlorure de mercure...1,36 g ; Iodure de potassium ....5 g ; Eau distillée....qsp 100 ml.	Réactifs généraux des alcaloïdes ; donne avec les alcaloïdes un précipité blanc.
EtOH	Ethanol	MM : 46,06 g/mol ; Point de fusion : -114 °C ; Point d'ébullition : 79 °C ; Température d'auto- inflammation: 423 à 425 °C ; Pression de vapeur saturante : à 20 °C : 5,8 kPa ;	Liquide incolore, volatile, inflammable ; Solubilité : dans l'eau : miscible en toutes proportions et Complète dans les solvants polaires et apolaires (acétone, éther diéthylique).
MetOH	Méthanol	MM 32.04 g/mol ; Essai (GC surface %) : Min 99.5% ; Poids/ml à 20°C : 0.790-0.793 g ; Indice de réfraction (20° ; 589nm) : 1.328-1.331 ; Matière non volatile : Max 0.005% ; Aldéhydes et cétones ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO: Max 0.1% ; Eau (H <sub>2</sub> O) max 0.25%.	Liquide et vapeur très inflammables ; toxique.
/	Ether de pétrole	L'éther de pétrole le plus usité est la fraction 40 à 65 °C ; point d'ébullition : 35 °C.	Solvant apolaire, aprotique inflammable et dangereux pour l'environnement ; appelé essence G
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Hexane	MM : 86.17 g/mol ; Point de fusion : -9 5,3 °C ; Point	Liquide incolore, volatil, d'odeur

		d'ébullition : 68,73 °C ; Température d'auto-inflammation: 225 °C ; Point d'éclair : - 23 à - 21,7 °C ;	caractéristique, très toxique et inflammable.
Gélose MH	Gélose Muller Hinton	Compositions : infusion de viande de bœuf : 300,0 ml ; Peptone de caséine : 17,5 g ; Amidon de maïs : 1,5 g ; Agar : 17,0 g ; pH = 7,4.	REF : M210-500G ; milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion.
BHIB Antibiotique AZTREONA M. (ATM 30µg).	Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur-cerveille)	Compositions : protéose-peptone 10,0 g ; Infusion de cervelle de veau 12,5 g ; Infusion de cœur de bœuf 5,0 g ; Glucose 2,0 g ; Chlorure de sodium 5,0 g ; Hydrogénéons phosphate de sodium 2,5 g ; pH = 7,4.	REF : M173-500G ; Milieu polyvalent riche ; utilisé pour la recherche de la Coagulase libre et la DNase thermostable des Staphylococcus.

Tableau A.2 : Caractéristiques de l'appareillage utilisé.

Appareils	Caractéristiques
Etuve de séchage à convection	Plage de température : De 5°C au-dessus de la température ambiante jusqu'à 300°C ; Convection naturelle ; Clapet d'air réglable ; Contrôleur avec fonction de temporisation 2 clayette-grilles chromées ; Intérieure et extérieure acier inox ; Tension 230VAC, fréquences 50 Hz.
Broyeur électrique	Couleur : argent ; Matériel : acier inoxydable ; Fréquences : 50Hz ; Tension : 220-240V ; Puissance : 120W ; Taille : 160*93 mm ; Vitesse : 14500 tours par minute.
Plaque chauffante (Heidolph MR 3001 X).	Plage de vitesses de rotation : 100 - 1 400 tr/mn ; Précision de la vitesse : $\pm 2$ % ; Capacité maximale d'agitation (H <sub>2</sub> O) : 20 l ; Température de la plaque chauffante : 20 - 300 °C ; Puissance de chauffe : 800 W.
Balance analytique (DENVER INSTRUMENT -SI-2002)	Capacité : 2000g ; lisibilité : 0.01g ; summit series toploading balance, 2000g*0.01g, 115V.
Pompe à vide	Trompe à eau pour génération du vide au laboratoire, en matière plastique ; avec clapet anti-retour ; 2 raccords cannelés ; tuyau de branchement au robinet ; 2 colliers de serrage.
Lampe UV (ePacket)	UV/LED Nail Lamp ; Puissance : 36 W ; Energie : AC100-240V 50/60HZ. Production : 5V/1A-2A. Emission à 365nm ; Temps : 30 sec à 2 min.
Rotavapeur (ROTARY EVAPORATOR-SOLB)	Dimension/poids (mm/Kg) :465*457*583 /15,0 ; Puissance (W):1400 ; Tension (V) :220 ; Fréquences (Hz) :50/60 ; Rotation direction : réversible ; Plage de vitesse (rpm) :20-280 ; Gamme de chauffage (°C) :

	ambiante +5 à 180 ; Plage de réglage de l'heure (min) :1-999 ; Vitesse et temps d'affichage d'heure : LCD ; Classe de protection : IP 20.
Centrifugeuse (Hettich EBA20)	Tension: 208-240V, 50/60Hz ; Courant: 0.28A ; Vitesse: jusqu'à 8 000 tr/min (selon le rotor) ; Rotor: E1624 8000 tr/min 8x 35g ; Angle rotor: 33° ; FCR max.: 3 461/6 153 ; Capacité: 8 tubes 15 ml ; Dimensions extérieures (L) x (P) x (H): 23,5 x 29 x 21 cm.
Réfractomètre d'Abbe classique	Modèle : NART-4T ; Gamme : indice de réfraction (nD) : de 1,4700 à 1,8700 ; Echelle minimale : 0.001 ; précision : indice de réfraction (nD) : +/- 0,0002 ; Température ambiante : de 5 à 40°C ; Plage de température : de 5 à 50°C ; Source lumineuse : LED (la raie D, longueur d'onde 589nm) ; Dimension et poids : 13*18*23cm, 2,5Kg (réfractomètre) ; 10*11*7cm, 0,5Kg (Thermomètre) ;
Autoclave	Volume : 47 l 60 l 180 l ; Température max : 132°C ; Profondeur : 470mm 580mm ; Type de construction: vertical ; largeur : 680mm 780mm.



Fig.A.1 : Réfractomètre d'Abbe classique

## Annexe 2 : CPG/SM

Les chromatogrammes de l'analyse de l'huile essentielle des feuilles *d'Inula Viscosa* des deux régions par CPG/SM sont représentés ci-dessous :

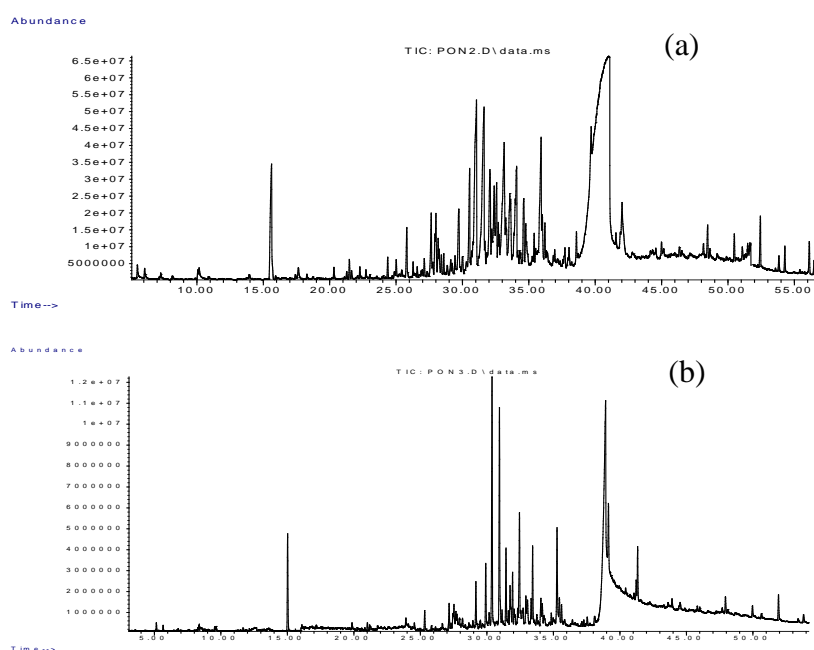


Figure A.1 : Chromatogrammes de l'analyse de l'HE des feuilles *d'Inula Viscosa*, (a) : Iferhounene, (b) : Ouadhias.

### Annexe 3 : Screening phyto-chimique

Aperçu des images des tests phyto-chimiques effectués durant notre travail :

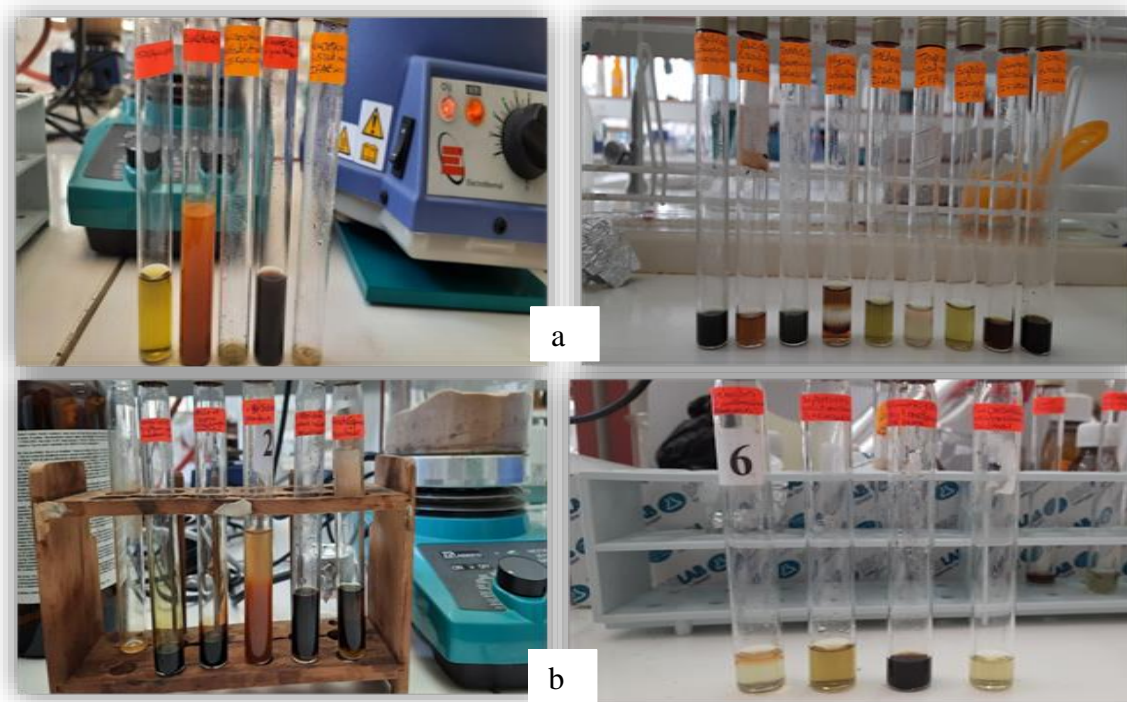


Fig.A.1 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-méthanoïque des deux régions, (a : Iferhounene) et (b : Ouadhias).

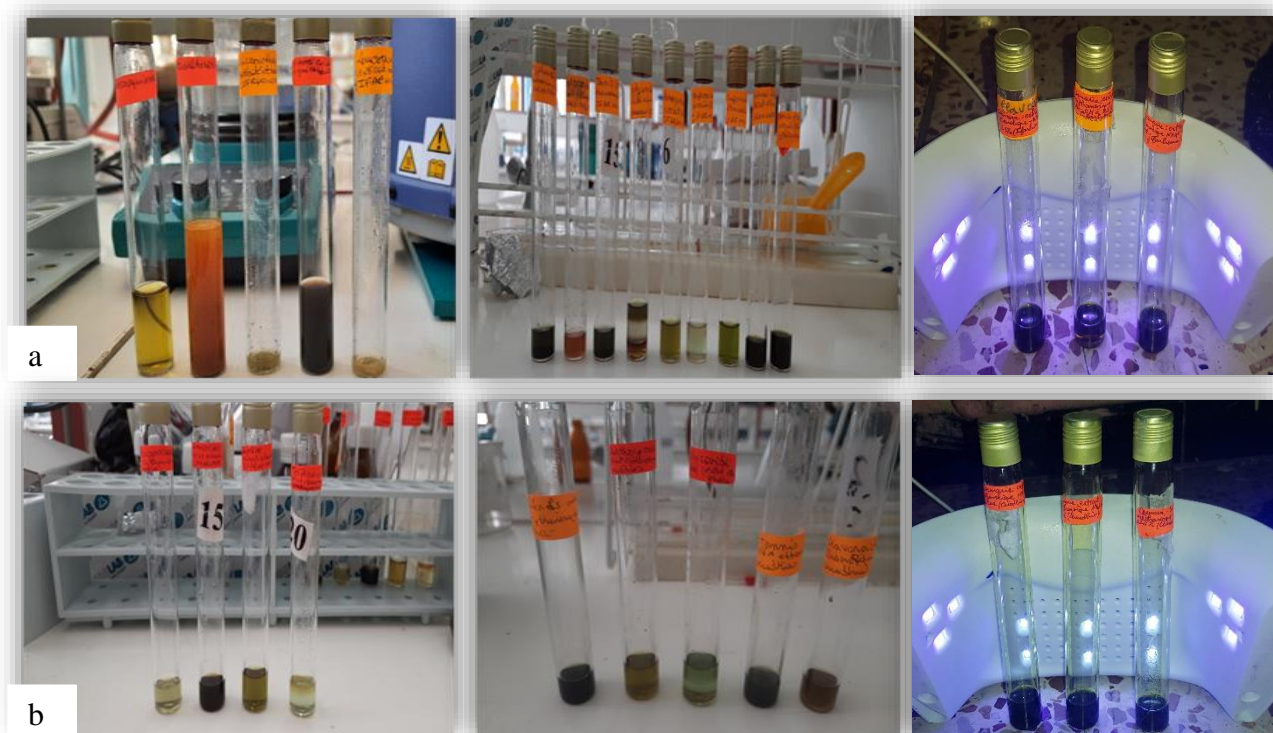


Fig.A.2 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles : Extrait hydro-éthanolique des deux régions, (a : Iferhounene) et (b : Ouadhias).



Fig.A.3 : Composition phyto-chimique des infusés des feuilles d'*Inula Viscosa*.

#### Annexe 4 : HPLC



Fig.A.1 : Appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance

Le chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles *d'Inula Viscosa* par HPLC :

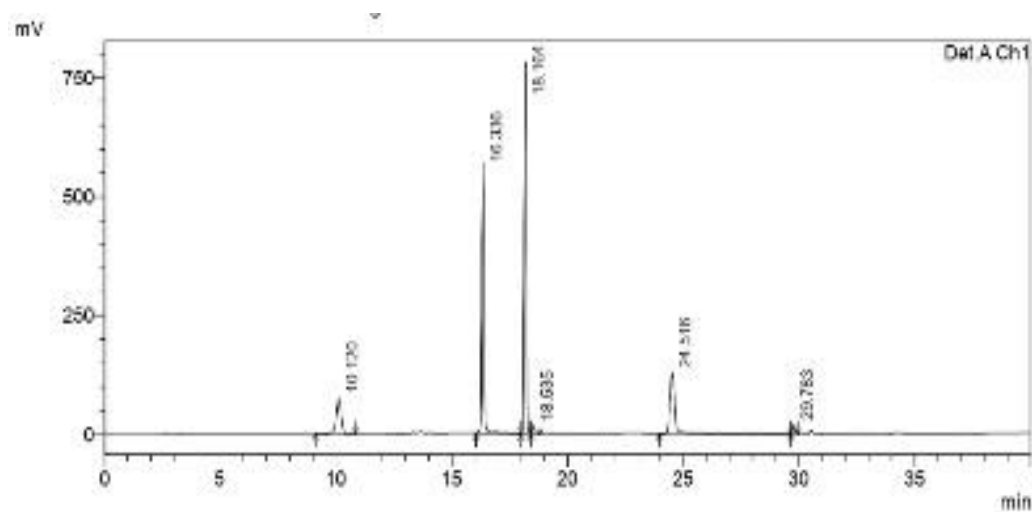


Fig.A.2 : Chromatogramme de l'analyse des polyphénols des feuilles *d'Inula Viscosa* : solutions standards

### Annexe 5 : Formulation galénique



Fig.A.1 : Préparation des crèmes pharmaceutiques. Crème 1 : crème test, crème 2 : à base d'HE, crème 3 : à base d'extrait hydro-méthanoïque, crème 4 : à base d'extrait hydro-éthanolique.

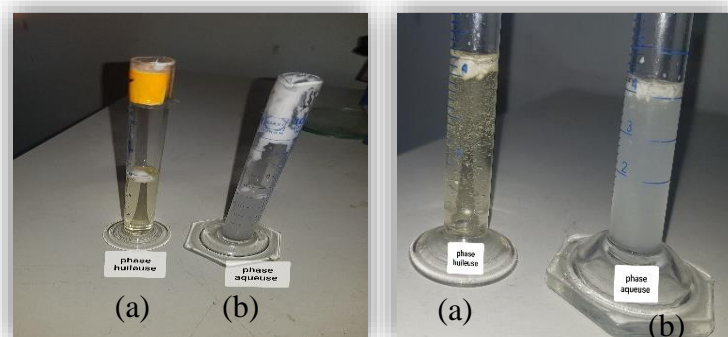


Fig.A.2 : Test de la goutte pour la crème pharmaceutique préparée. (a) : phase huileuse, (b) : phase aqueuse



Fig.A.3 : Test de centrifugation pour les crèmes formulées :  
crème 1 : crème test, crème 2 : à base d'HE, crème 3 : à base  
d'extrait hydro-méthanoïque, crème 4 : à base d'extrait  
hydro-éthanolique,



Fig.A.4 : Microscope photonique



Fig.A.5 : Examen microscopique : Crème 1 : crème test, crème 2 : à base d'HE, crème 3 : à base d'extrait hydro-méthanoïque, crème 4 : à base d'extrait hydro-éthanolique.

### Annexe 6 : Etude antibactérienne

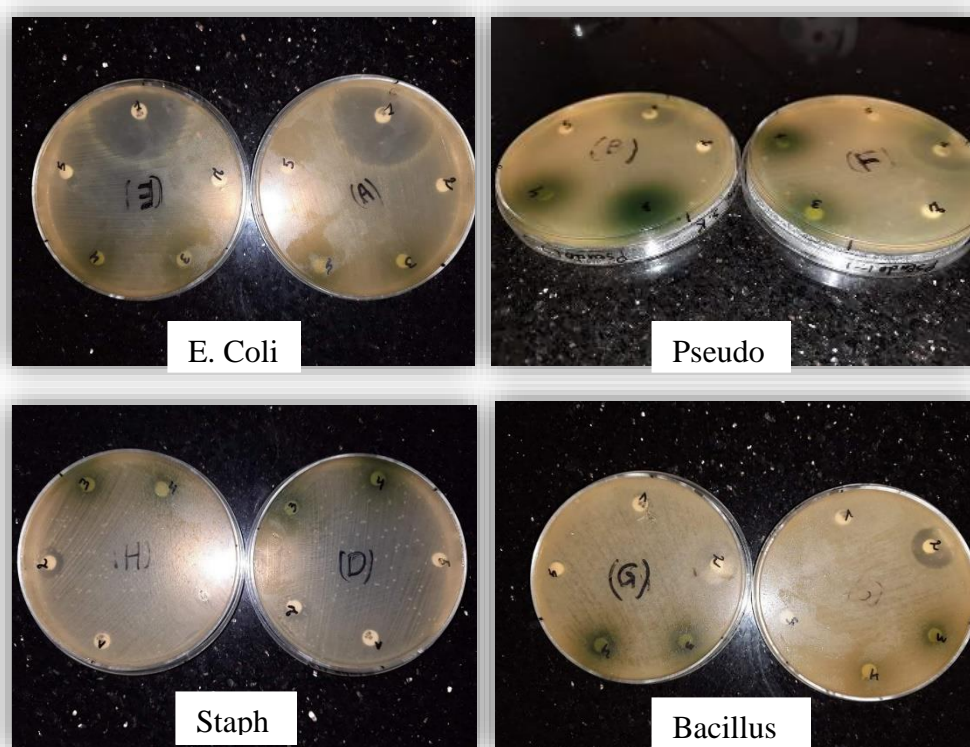


Fig.A.1 : Lecture après 24h après incubation pour les deux tests.

## Résumé

L'objectif de ce travail est l'extraction, l'identification de biomolécule et la mise en évidence de la bioactivité des extraits entrant dans la composition de la plante médicinale *Inula Viscosa*. Appartenant au genre *Dittrichia*, cette dernière fait partie de la famille des Astéracées. Elle est récoltée au niveau des deux communes Iferhounene (Village Soumeur) et Ouadhias (wilaya de Tizi-Ouzou, centre Est de l'Algérie) durant la période de floraison.

L'huile essentielle extraite par hydrodistillation de type Clevenger, à partir des feuilles séchées a donné des rendements de 0.13 % 0.19 %. L'analyse par CPG/SM a montré que le composé majoritaire (3.943%, Iferhounene) et (7.872%, Ouadhias) de l'huile essentielle, est le caryophyllène oxide.

L'analyse phyto-chimique qualitative réalisée sur les feuilles d'*Inula Viscosa* a mis en évidence la présence des polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponines, dérivés anthracéniques libres, O-hétérosides à génine réduite et en -C-Hétéroside, glycosides cardiaques, quinones libres, coumarines, stérols et triterpènes et ce pour les deux régions.

L'extraction des polyphénols par macération à froid, pour le solvant méthanol à 70%, sont obtenus avec des rendements de 25.55% pour la région d'Iferhounene et 24.35% pour la région de Ouadhias, comparés aux rendements obtenus pour le solvant éthanolique 17.65% (Iferhounene) et 12.95% (Ouadhias).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Inula Viscosa* de la région Ouadhias, testée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, a démontré un effet inhibiteur sur *Bacillus Subilis* et *Staphylococcus Aureus*. Pour les extraits par solvant, l'extrait méthanoïque, présente une légère activité inhibitrice sur la souche *Bacillus Subilis*.

**Mots clés :** *Inula Viscosa*, Extraction, huile essentielle, Identification, activité antibactérienne.

## Abstract

The objective of this work is the extraction, the identification of biomolecule and the demonstration of the bioactivity of the extracts entering into the composition of the medicinal plant *Inula Viscosa*. Belonging to the genus *Dittrichia*, the latter is part of the Asteraceae family. It is harvested at the communes of Iferhounene (Soumeur village) and Ouadhias (wilaya of Tizi Ouzou, central eastern Algeria) during the flowering period.

The essential oil was extracted by Clevenger hydrodistillation from the dried leaves gave yields of 0.13 % and 0.19 %. GC / MS analysis shows that the major compound (3.943%, Iferhounene) and (7.872%, Ouadhias) of the essential oil is caryophyllene oxide.

The qualitative phytochemical analysis performed on the leaves of *Inula Viscosa* showed the presence of polyphenols, flavonoids, tanins, saponines, free anthracene drifts, Reduced genin O-Heterosides and -C-Heteroside, cardiac glycosides, free quinones, coumarines and sterols and triterpenes, and this for both regions.

The extraction of polyphenols by cold maceration for the 70% methanol are obtained with yields of 25.55% for the Iferhounene region and 24.35% from the Ouadhias region, compared to the yields obtained for ethanolic solvent are 17.65% (Iferhounene) and 12.95% (Ouadhias).

The antibacterial activity of the essential oil of *Inula viscosa* from the Ouadhias region, tested by the agar medium diffusion method, demonstrated an inhibitory effect on *Bacillus Subilis* and *Staphylococcus Aureus*. For solvent extracts, the methanoic extract, exhibits a slight inhibitory activity on the *Bacillus Subilis* strain.

**Keywords:** *Inula Viscosa*, Extraction, essential oil, Identification, antibacterial activity.